

Postverlagsort Berlin

# ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN  
KIEL

B. SCHARRER  
NEW YORK

J. SEILER  
ZÜRICH

54. BAND, 6. (SCHLUSS-)HEFT

MIT 113 TEXTABBILDUNGEN  
(ABGESCHLOSSEN AM 2. AUGUST 1961)



SPRINGER-VERLAG  
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG  
1961

Z.  
Zellforsch.

Preis DM 49.80

# Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von R. Goldschmidt und W. von Möllendorff. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von W. von Möllendorff und J. Seiler, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGSchen Archivs für mikroskopische Anatomie. (Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von Max Schultze; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von v. La Valette St. George, W. Waldeyer; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von W. Roux, H. Braus, H. Spemann.)

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma“, Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie“ weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

## Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319  
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

## 54. Band

## Inhaltsverzeichnis

## 6. (Schluß-)Heft Seite

FÄHRMANN, W., Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Nervensystems von <i>Unio tumidus</i> (PHILIPSSON) unter besonderer Berücksichtigung der Neurosekretion. Mit 28 Textabbildungen . . . . .	689
PRABHU, V. K. K., The structure of the cerebral glands and connective bodies of <i>Jonespeltis splendidus</i> VERHOEFF (Myriapoda: Diplopoda). With 12 Figures in the Text . . . . .	717
FUJITA, H., and J. F. HARTMANN, Electron microscopy of neurohypophysis in normal adrenaline-treated and pilocarpine-treated rabbits. With 21 Figures in the Text . . . . .	734
PEYROT, A., et G. MASSIMELLO, Le rein du triton crêté ( <i>Triturus cristatus carnifex</i> . LAUR.) Étude morphologique, cytologique et cytochimique. Avec 23 Figures dans le Texte . . . . .	764
CAESAR, R., Elektronenmikroskopischer Nachweis von Fettpartikeln im Disseschen Raum. Mit 9 Textabbildungen . . . . .	793
SCHMIDT, W., Elektronenmikroskopische Untersuchung des intrazellulären Stofftransportes in der Dünndarmepithelzelle nach Markierung mit Myofer. Mit 3 Textabbildungen . . . . .	803
KÜHNEL, W., Morphologische und experimentelle Untersuchungen an der Allantois des Hühnchens. Mit 17 Textabbildungen . . . . .	807
Autorenverzeichnis . . . . .	831

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.



Aus dem Zoologischen Institut der Universität Münster i. Westf.  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. B. RENSCH)

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN  
DES NERVENSYSTEMS VON *UNIO TUMIDUS* (PHILIPSSON) UNTER  
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER NEUROSEKRETION

Von  
WALTER FÄHRMANN

Mit 28 Textabbildungen  
(Eingegangen am 14. März 1961)

Inhalt	Seite
A. Einleitung . . . . .	689
B. Material und Methode . . . . .	690
C. Ganglien . . . . .	690
I. Nervenzellen . . . . .	691
a) Lichtmikroskopische Ergebnisse S. 691. — b) Elektronenmikroskopische Ergebnisse S. 695.	
II. Gliazellen . . . . .	700
a) Lichtmikroskopische Ergebnisse S. 700. — b) Elektronenmikroskopische Ergebnisse S. 702.	
D. Nerven, Konnektive und Kommissur . . . . .	704
a) Lichtmikroskopische Ergebnisse S. 704. — b) Elektronenmikroskopische Ergebnisse S. 707.	
E. Diskussion . . . . .	711
Zusammenfassung . . . . .	714
Literatur . . . . .	715

A. Einleitung

Unter der Vielzahl der Untersuchungen über die Neurosekretion bei wirbellosen Tieren befinden sich nur sehr wenige Arbeiten, die die Verhältnisse bei den Lamellibranchiaten behandeln. GABE (1955) untersuchte eine Reihe mariner Muschelarten und fand bei allen neurosekretorische Zellen in den Cerebral- und Viszeralganglien. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte auch LUBET (1955a, 1955b, 1956) bei den marinen Arten *Chlamys varia* und *Mytilus edulis*, bei denen er außerdem einen Zusammenhang von Neurosekretion und Sexualzyklus feststellen konnte. Da die Neurosekretion bei Süßwassermuscheln bisher nicht bearbeitet worden ist, war zunächst festzustellen, ob in allen Ganglien neurosekretorische Zellen auftreten und ob unterschiedliche neurosekretorische Zelltypen vorliegen. Angeregt durch die Ergebnisse von LUBET (Zusammenhang von Neurosekretion und Sexualzyklus) und KRAUSE (1960, jahreszyklische Veränderungen der Neurosekretion bei *Helix pomatia*) sollten die jahreszeitlichen Schwankungen der Neurosekretproduktion untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Funktion des Neurosekrets ziehen zu können. Die Kleinheit der Nerven- und Gliazellen machte es notwendig, in Parallele zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen auch elektronenmikroskopische Studien durchzuführen, die insbesondere für die Analyse der Ableitung des Neurosekrets erforderlich waren. Für Lamellibranchiaten liegen

bisher nur elektronenmikroskopische Untersuchungen über „Golgi-bodies“ in Ganglienzellen von *Meretrix* (KITADA 1958) vor.

Frau Prof. Dr. A. NOLTE bin ich für die Stellung des Themas und das stete Interesse am Fortschreiten der Arbeit zu Dank verpflichtet, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. B. RENSCH für die Unterstützung von seiten des Instituts.

## B. Material und Methode

Als Untersuchungsmaterial wählte ich die Süßwassermuschel *Unio tumidus* (PHILIPSSON), die das ganze Jahr über in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Alle Muscheln stammen von demselben Fundort aus der Werse bei Münster i. Westf.

Die Präparation der Ganglien erfolgte am lebenden Tier sofort nach dem Fang. Von einer Narkose wurde abgesehen, um eventuelle Veränderungen der Neurosekretion zu vermeiden.

Als Fixiergemische kamen in erster Linie Susa (nach HEIDENHAIN) und Bouins Gemisch zur Anwendung. Daneben wurden einige Gehirne in Champy fixiert. Einbettung über Methylbenzoat und Benzol in Paraffin. Neben Normalserien wurden Auszugsserien für vergleichend-färbereische Untersuchungen hergestellt. Schnittdicke 4  $\mu$ .

Zur Darstellung des Neurosekrets färbte ich mit Gomoris Chromhämatoxylin-Phloxin (1941) nach BARGMANN (1949) und Paraldehydfuchsin nach GOMORI-GABE (GABE 1953; zur Erzielung eines besseren Kontrastes wurde das Pikroindigokarmin durch eine 0,1%ige Lichtgrünlösung in 90% Alkohol ersetzt). Die Nissl-Substanz färbte ich mit Galloeyanin-Chromalaun (ROMEIS 1948, § 1749), zur Darstellung der Lipoiden benutzte ich Sudanschwartz B (ROMEIS 1948, § 1050). Einige in Champy fixierte Präparate wurden mit Säurefuchsin-Kristallviolett-Aurantia (ROMEIS 1948, § 1016) gefärbt.

122 Muschelgehirne — zu verschiedenen Jahreszeiten fixiert — wurden lichtmikroskopisch untersucht.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen fixierte ich nach der Methode von WOHLFARTH-BOTTERMANN (1957) kleine Stücke von Ganglien, Nerven und Konnektiven, wobei das Material zunächst in Kaliumbichromat-Osmiumsäure bei  $pH$  7,1–7,2 fixiert und anschließend in Uranylacetat (STRUGGER 1956) und Phosphorwolframsäure in 70% Alkohol kontrastiert wurde. Einbettung in Methacrylat (8 Teile Butyl- zu 2 Teilen Methylmethacrylat).

Herstellung der Dünnschnitte mit dem Ultramikrotom der Firma Leitz unter Verwendung von Glas- und Diamantmessern. Alle Aufnahmen wurden mit dem Siemens-Elmiskop I (Strahlspannung 60 kV, Objektivaperturblennde 20  $\mu$ )<sup>1</sup> gemacht. Elektronenmikroskopische Vergrößerungen 2800–20000fach, Nachvergrößerung 1,5–4mal. Zur Auswertung wurden 750 Aufnahmen herangezogen.

## C. Ganglien

Eine genaue Beschreibung des Nervensystems von *Unio tumidus* (PHILIPSSON) liegt nicht vor. Der Vergleich mit dem durch SPLITTSTÖTZER (1913) sorgfältig untersuchten Nervensystem von *Anodonta cellensis* (SCHRÖTER) zeigt, daß bei *Unio* ähnliche Verhältnisse bestehen. Ich übernehme daher die Nomenklatur aus dieser Arbeit, jedoch mit der Abwandlung, daß als Kommissur nur die Verbindung zwischen den beiden Cerebralganglien und als Konnektiv die Verbindung zwischen zwei verschiedenartigen Ganglien bezeichnet wird (u.a. LANG 1900).

Untersucht wurden die Cerebral-, Pedal- und Viszeralganglien (Abb. 1), die in ihrem histologischen Aufbau sehr ähnlich sind. Sie werden von einer dünnen bindegewebigen Hülle umschlossen. Darauf folgt nach innen der Bereich der Nerven- und Gliazellen und zentral die Fasermasse.

<sup>1</sup> Für die Herstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Fräulein R. HÖRIG, Physikalisches Institut.



## I. Nervenzellen

a) **Lichtmikroskopische Ergebnisse.** Die Nervenzellen von *Unio tumidus* zeigen keine starken Größenunterschiede. Messungen von je 100 Nervenzellen der verschiedenen Ganglien ergaben, daß ihr Durchmesser zwischen 8 und 48  $\mu$  schwankt, wobei die Mehrzahl der Zellen einen Durchmesser von 15—25  $\mu$  aufweist. Im Viszeralganglion sind die Zellen durchschnittlich etwas größer. Hier finden sich auch die größten Nervenzellen mit einem Durchmesser über 40  $\mu$ .

Mit Hilfe des Paraldehydfuchsin nach GOMORI-GABE und des Chromhämatoxylin-Phloxins nach GOMORI-BARGMANN lassen sich in den Nervenzellen von *Unio tumidus* zwei verschiedene Sekrete nachweisen, wobei nach Susa- oder Bouin-Fixierung das eine vakuolisiert erscheint, das andere granulär erhalten bleibt. In den folgenden Ausführungen bezeichne ich das erstgenannte Sekret als Grana I (Neurosekret I), das letztgenannte als Grana II (Neurosekret II).

Die *Grana I* sind in fast allen Nervenzellen der untersuchten Ganglien zu finden. Nach Färbung mit Paraldehydfuchsin erscheinen sie bei schwächerer Vergrößerung als rotviolette Grana. Bei stärkerer Vergrößerung (Ölimmersion) erkennt man aber, daß es sich um kleine ring- oder halbmondförmige Gebilde handelt, die an den Rändern unterschiedlich großer Vakuolen (Durchmesser etwa 1—4  $\mu$ ) liegen und nur selten einen granulären Aufbau zeigen (Abb. 2). Diese Vakuolisierung ist ein Charakteristikum der Grana I

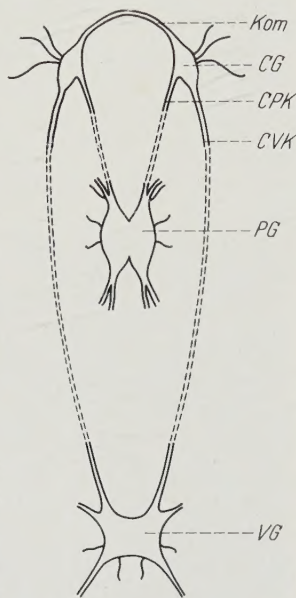


Abb. 1. Nervensystem von *Unio tumidus* (schematisch). CG Cerebralganglion, PG Pedalganglion, VG Viszeralganglion, Kom Kommissur, CPK Cerebropedalkonnektiv, CVK Cerebroviszeral-konnektiv

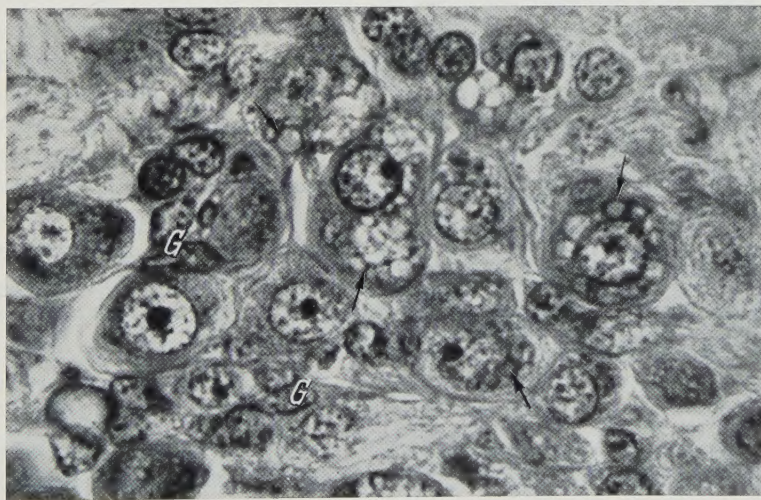


Abb. 2. Ausschnitt aus der Nerven-Gliazellschicht, Cerebralganglion. Grana I ( $\nearrow$ ) nur als Reste erhalten. G Gliazellen. Susa, Paraldehydfuchsin. Vergr. 1200:1

nach Susa- oder Bouin-Fixierung. Die Lage der Grana innerhalb der Nervenzellen ist unterschiedlich. Sie befinden sich oft in der Nähe des Kernes oder im Achsenfaserkonus und treten nie im Axon auf. Ihre Menge ist von Zelle zu Zelle verschieden.

Die *Grana II*, die sich mit Paraldehydfuchsin intensiver rotviolett färben als die Grana I und niemals Vakuolisierung zeigen, finde ich in nur wenigen Nervenzellen. Diese Zellen kommen in allen Ganglien vor und sind — abgesehen von einer schwachen Tendenz zu dorsaler Lage — in den Cerebral- und Pedalganglien unregelmäßig verteilt. Im Viszeralganglion, in dem diese Zellen am häufigsten auftreten, liegen sie bevorzugt am proximalen und distalen Rand des Ganglions

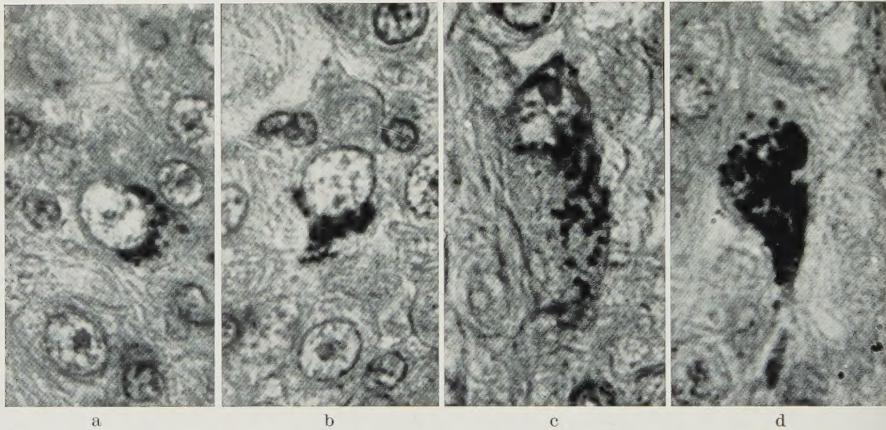


Abb. 3a—d. Nervenzellen mit verschieden starker Anreicherung der Grana II. a Cerebralganglion, Susa. b u. c Viszeralganglion, Susa. d Viszeralganglion, Bouin. a—d Chromhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 1200:1

und fehlen in den lateralen Gebieten. Die Grana II-führenden Zellen sind klein bis mittelgroß (Durchmesser 15—20  $\mu$ ); im Viszeralganglion sind sie durchschnittlich etwas größer. In Zellen über 25  $\mu$  Durchmesser kann ich die Grana II nicht nachweisen. Sie haben einen Durchmesser von 0,6—1,2  $\mu$ , sind also kleiner als die Grana I. Die Grana liegen meist dicht am Kern und in Richtung zum Achsenfaserkonus. Gelegentlich findet man sie auch locker über die Zelle verteilt oder in größerer Menge die ganze Zelle mehr oder weniger ausfüllend. Sie lassen sich bis in den Achsenfaserkonus verfolgen (Abb. 3a—d).

Der Unterschied in der Farbintensität zwischen Grana I und II wird noch deutlicher bei der Färbung mit Chromhämatoxylin-Phloxin, die ich vergleichsweise an Präparaten der Auszugsserien von 33 Gehirnen (aus verschiedenen Jahreszeiten) durchführte. Die Grana I nehmen nur einen grauen Farbton an, während die Grana II tief schwarzblau erscheinen. Auch bei dieser Färbung ist die Vakuolisierung der Grana I bei stärkerer Vergrößerung sichtbar.

Da ich bei den parallel laufenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen in den Nervenzellen stets kompakte, gut erhaltene Einschlußkörper ohne Vakuolen fand (vgl. S. 696 und Abb. 6), wurden weitere Untersuchungen der Grana I notwendig.



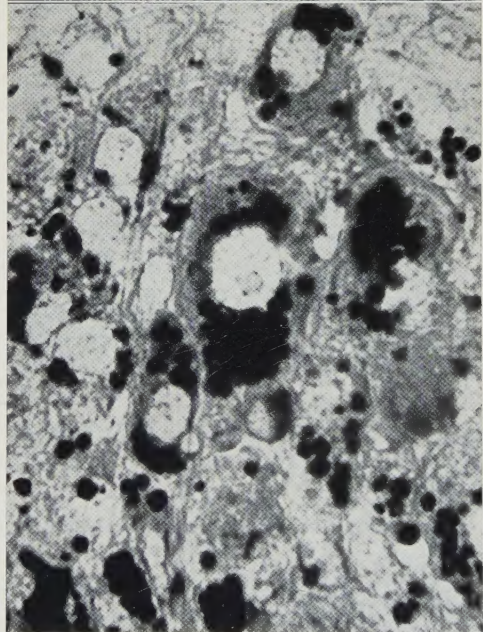
In *Zupfpräparaten* von frisch präparierten Ganglien lassen sich in fast allen Nervenzellen unterschiedliche Mengen von Grana nachweisen, die eine goldgelbe Eigenfarbe besitzen. Sie sind homogen und von rundlicher bis unregelmäßiger Gestalt. In den älteren Arbeiten über die Histologie des Nervensystems der Lamellibranchiaten werden diese Einschlüsse als Pigmente beschrieben (SCHULTZE 1879 u.a. bei *Unio pictorum* und *Anodonta*, RAWITZ 1887 u.a. bei *Unio pictorum* und *Anodonta anatina*, BOCHENEK 1905 bei *Anodonta*). Bei *Unio tumidus* liegt ihr Durchmesser zwischen  $1,2-5\mu$ . Am häufigsten kann ich einen Durchmesser um  $2\mu$  feststellen. Diese Werte decken sich mit den bei der elektronenoptischen Untersuchung für die Grana I ermittelten — bei Berücksichtigung von Schrumpfungen, die durch die Fixierung unvermeidlich sind — und liegen gleichfalls im Größenbereich der vakuolisierten Grana in susa- oder bouin-fixierten Präparaten.

Die Annahme liegt nahe, daß die Vakuolisierung der Grana I durch Herauslösung vorhandener Fette oder Lipide entsteht. Um die Fettkomponente der Grana I besser zu erhalten, wurden einige Gehirne in Champy fixiert. An Paraffinschnitten lassen sich diese Grana mit Sudanschwarz B als kompakte Gebilde darstellen. Die Abb. 4a und b zeigen den Unterschied zwischen susa- und champyfixiertem Material sehr deutlich, ebenso klar die Übereinstimmung von Vakuolen und sudanophilen Grana.

Die Grana II, die auch nach Susa- oder Bouin-Fixierung vollständig erhalten bleiben, zeigen gleichfalls Sudanophilie. Um nachzuweisen, daß diese sudano-



a



b

Abb. 4a u. b. Ausschnitt aus der Nerven-Gliazellschicht, Viszeralganglion. a Grana I ( $\gamma$ ) durch Susa-Fixierung nur als Reste erhalten. G Gliazellen. Paraldehydfuchsin. b Grana I durch Champy-Fixierung weitgehend erhalten. Sudanschwarz B. Vergr. 1200:1



philen Grana mit den paraldehydfuchsinfärbbaren identisch sind, wurden charakteristische Zellen in Sudanschwarz-Präparaten fotografiert (Abb. 5a). Danach wurden die Präparate entfärbt und mit Paraldehydfuchsin (ohne Kernfärbung) behandelt. Die vorher schwarzen Grana sind nun intensiv rotviolett (Abb. 5b). Die Abb. 5c zeigt den benachbarten Schnitt aus der Auszugsserie, der mit Chromhämatoxylin-Phloxin gefärbt wurde. Hier erscheinen die Grana II tief schwarz.

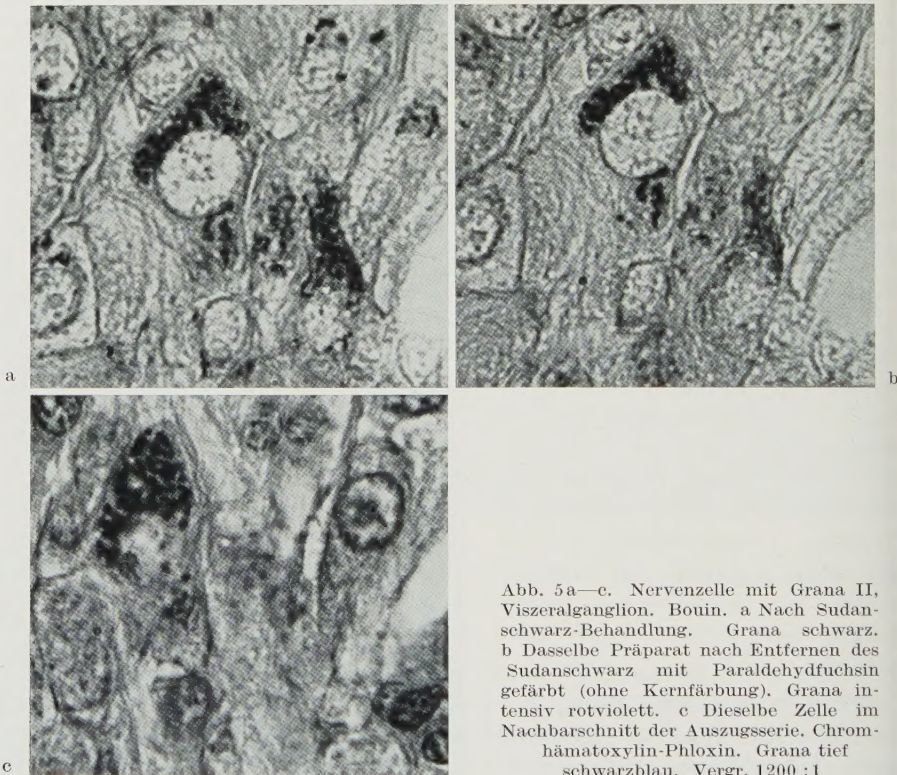


Abb. 5a—c. Nervenzelle mit Grana II, Viszeralganglion. Bouin. a Nach Sudanschwarz-Behandlung. Grana schwarz. b Dasselbe Präparat nach Entfernen des Sudanschwarz mit Paraldehydfuchsin gefärbt (ohne Kernfärbung). Grana intensiv rotviolett. c Dieselbe Zelle im Nachbarschnitt der Auszugsserie, Chromhämatoxylin-Phloxin. Grana tief schwarzblau. Vergr. 1200 : 1

blau. Nach Susa- oder Bouin-Fixierung sind aber auch die Reste der Grana I mit Sudanschwarz B darstellbar. Sie müssen demnach noch schwerlösliche Fette enthalten.

Die beiden Granatypen, die sich mit Paraldehydfuchsin und Chromhämatoxylin durch die unterschiedlichen Farbintensitäten differenzieren lassen — die Grana II sind stets intensiver getönt —, zeigen eine übereinstimmende Affinität zu Sudanschwarz B nach Champy-Fixierung. Während aber die sudanophilen Komponenten der Grana II auch nach Bouin- und Susa-Fixierung erhalten bleiben, lassen sich von den Grana I nach diesen Fixierungen nur noch Reste am Rande von Vakuolen mit Sudanschwarz darstellen. Die Hauptmenge der Fett- oder Lipoidsubstanzen muß demnach herausgelöst worden sein. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen sprechen also zugunsten der Annahme, daß in den Nervenzellen der Ganglien von *Unio tumidus* zwei Sekrete produziert werden.



Der Versuch, in den Nervenzellen mit Grana I und mit Grana II cytologische Unterschiede festzustellen oder verschiedene Funktionszustände der beiden Zelltypen nachzuweisen, scheitert an der Kleinheit der Zellen und an dem schlechten Erhaltungszustand der Grana I nach Susa-Fixierung. Die Kerne sind in allen Ganglienzellen übereinstimmend relativ chromatinarm, von runder bis leicht ovoider Gestalt; sie haben glatte Konturen und besitzen 1—2 auffallend große Nucleoli. Die sehr feine Nissl-Substanz zeigt eine diffuse Verteilung (nach Färbung mit Galloeyanin-Chromalaun blau). Ihre Menge kann von Zelle zu Zelle etwas schwanken, jedoch sind die Differenzen nur gering und schwer zu beurteilen. Das Auftreten grober Nissl-Schollen kann ich nicht beobachten.

Um mengenmäßige Veränderungen der Grana und deren etwaige Zusammenhänge mit verschiedenen Funktionszuständen der Muschel (u.a. Reifung der Gameten, Eiablage) feststellen zu können, untersuchte ich Gehirne aus verschiedenen Jahreszeiten (pro Monat 8—10 Gehirne). Dabei wurden die Gehirne der männlichen und weiblichen Tiere gesondert beurteilt; außerdem wurde der Zustand der Gonaden studiert.

Durch die in erster Linie benutzte Susa-Fixierung werden die Grana I nur unvollständig dargestellt, so daß eine mengenmäßige Beurteilung — die immer nur subjektiv sein kann — fast unmöglich ist. Ich finde zwar Unterschiede im Laufe des Jahres, jedoch erscheint es mir gewagt, das Schema eines Jahreszyklus aufzustellen. Ganz allgemein kann ich feststellen, daß die Granamengen innerhalb der drei Ganglienpaare eines Tieres untereinander niemals große Unterschiede zeigen, daß ferner die stärksten Anreicherungen im Frühjahr (Februar-April) auftreten. Für eine genauere mengenmäßige Erfassung der Grana I müßten Gehirne zu verschiedenen Jahreszeiten in einem fettschonenden Fixiermittel konserviert werden. Die wenigen Gehirne, die ich gegen Ende meiner Untersuchungen mit Champy fixierte, geben mir für diesbezügliche Aussagen keine Möglichkeit.

Die Grana II bleiben wohl nach Susa-Fixierung erhalten, sind aber das ganze Jahr hindurch in allen Ganglien ohne größere quantitative Unterschiede nachweisbar. Am häufigsten finden sie sich immer im Viszeralganglion. Eine etwas stärkere Anreicherung kann ich in einigen Cerebralganglien (bei ♂♂ und ♀♀) im Frühjahr feststellen. Die Unterschiede sind jedoch relativ gering.

Eine Parallelisierung der teilweise größeren Anhäufung der Grana I und II im Frühjahr mit der Gonadenentwicklung zu dieser Zeit gelingt mir nicht. Die Fortpflanzungszeit von *Unio tumidus* erstreckt sich über mehrere Monate (März bis Mai), und die Gameten gleich großer Tiere desselben Fangdatums sind oft sehr verschieden weit entwickelt.

**b) Elektronenmikroskopische Ergebnisse.** Die durch die Kleinheit der Ganglien- und Gliazellen bedingten Schwierigkeiten bei der Deutung der lichtmikroskopischen Ergebnisse versuchte ich durch ergänzende elektronenoptische Untersuchungen zu überwinden. Geschnitten wurde nur die Nerven- und Gliazellschicht verschiedener Ganglien (2 Cerebral- und 3 Pedalganglien, 250 Aufnahmen) aus den Monaten März und April. Angesichts der geringen Zahl der Nervenzellen mit Grana II ist es nicht verwunderlich, daß ich auf den Ultradünnschnitten nur Zellen mit Grana I fand.



In den Nervenzellen mit Grana I kann ich zwei Typen von Einschußkörpern nachweisen, die im Größenbereich der Grana I liegen und in ähnlicher Häufigkeit auftreten (Abb. 6).

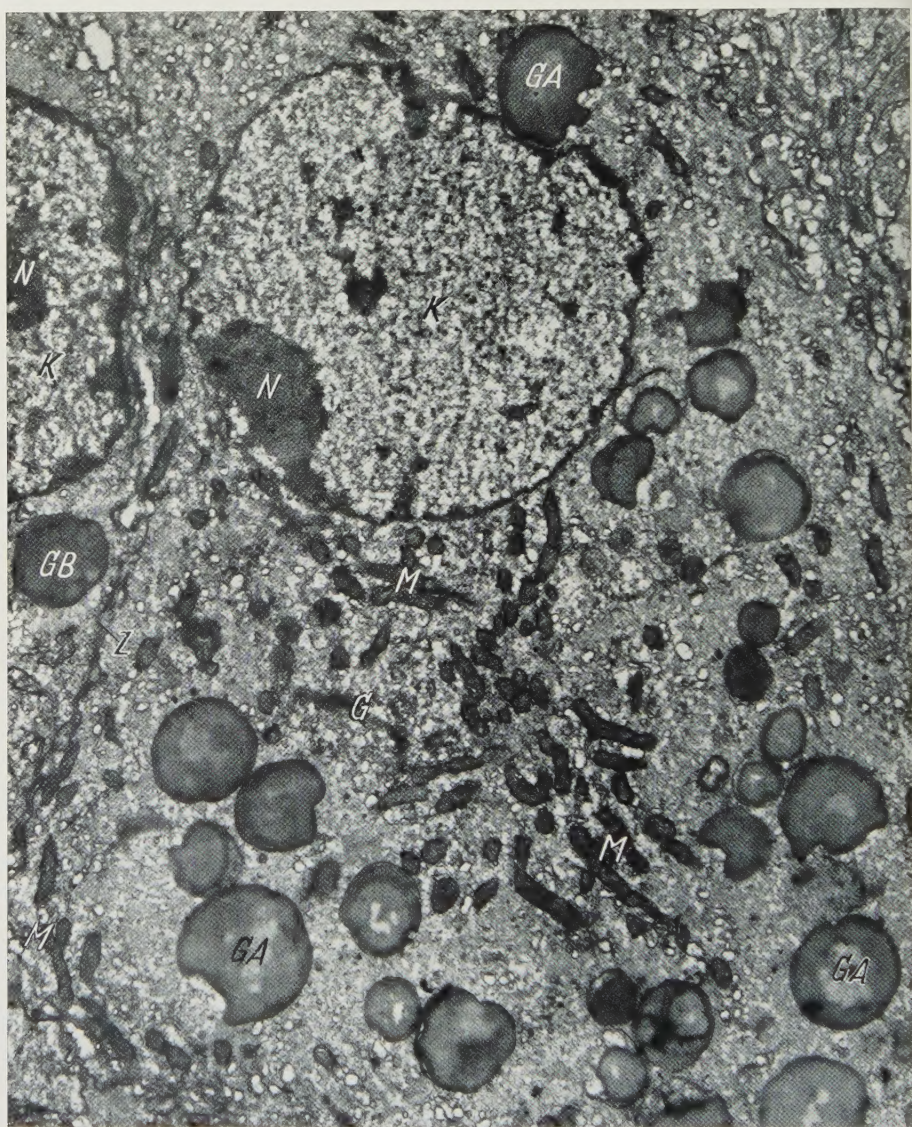


Abb. 6. Übersicht über eine Nervenzelle, Pedalganglion. *K* Kern, *N* Nucleolus, *M* Mitochondrien, *G* Golgi-Apparat, *GA* Grana I (Typ A), *GB* Grana I (Typ B), *Z* Zellmembran. Elektronenmikroskop. Vergr. 2800:1, Endvergr. 11 200:1

Typ A: Hier handelt es sich um rundliche bis unregelmäßig gelappte Grana unterschiedlicher Größe mit relativ homogenem Inhalt (Abb. 6). In ihre Außenschicht ist elektronenoptisch dichtes Material gelagert, welches sich zentralwärts verschieden stark aufhellt. Diese Aufhellungen sind stets unregelmäßig und



niemals streng konzentrisch. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man besonders in dem elektronenoptisch dichten peripheren Material eine Schichtung. Eine äußere Begrenzung der Grana durch Membranen konnte ich nicht immer deutlich erkennen. Gelegentlich ließ sich jedoch eine Doppelmembran nachweisen.

Typ B: Dieser Typ von Einschlüßkörpern erscheint im Gegensatz zum Typ A deutlich zusammengesetzt (Abb. 7a und b). Innerhalb eines dichten Materials, welches verschiedentlich aufgelockert sein kann, liegen Einschlüsse unterschiedlicher Größe und Form. Diese elektronenoptisch dichte „Grundsubstanz“ zeigt

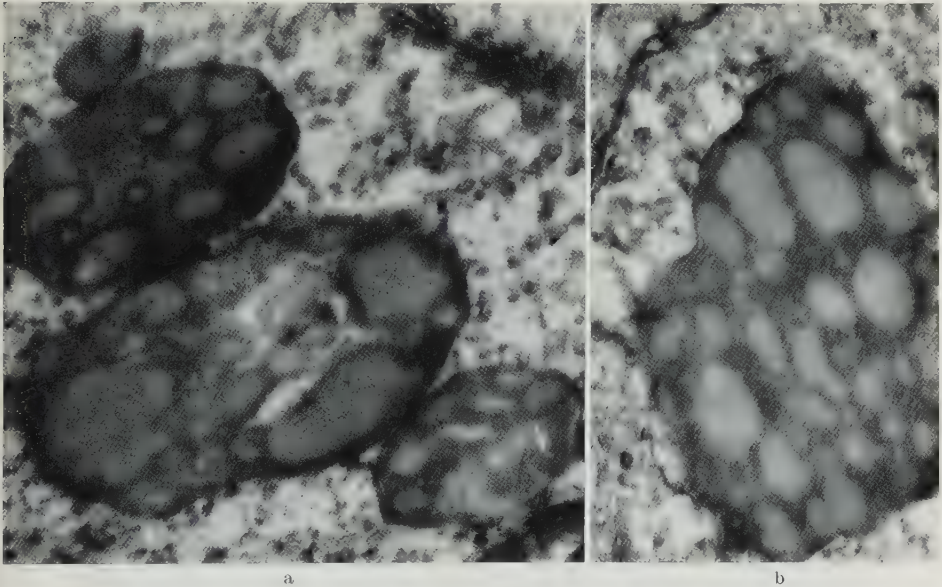


Abb. 7a u. b. Grana I vom Typ B. Elektronenmikrosk. Vergr. 20 000:1, Endvergr. 30 000:1

bei stärkerer Vergrößerung granulären oder geschichteten Aufbau. In den Einschlüssen kann dichteres Material peripher gelagert sein und sich nach innen mehr oder weniger aufhellen. Die allerdings bedeutend kleineren Einschlüsse haben also einen ähnlichen Grundaufbau wie jene des Typus A. Gelegentlich fehlt das randständige dunklere Material, so daß nur noch gleichmäßig helle Einschlüsse in einem Granum vom Typ B liegen (Abb. 7b). Die äußere Begrenzung der Grana verhält sich wie jene vom Typ A.

Die Einschlüßtypen A und B können nebeneinander in einer Zelle vorkommen, jedoch ist überwiegend nur ein Typ pro Zelle vorhanden. Größe und Lage der Körper entspricht der der Grana I (Anreicherungen in Kernnähe, zum Teil dicht dem Kern anliegend oder im Achsenfaserkonus). Meines Erachtens handelt es sich um zwei verschiedene Entwicklungsstufen eines Sekrets, wobei sich wahrscheinlich der Typ B von A ableitet. Lichtmikroskopisch ist eine Differenzierung der Grana I in zwei Typen nicht möglich, weil nach Susa-Fixierung die Fettkomponente weitgehend herausgelöst ist und somit nur Reste anfärbbar sind und weil nach Champy-Fixierung die Grana mit Sudanschwarz homogen dargestellt werden.

Über die *Genese* dieser Grana kann ich keine endgültige Aussage machen. Die Möglichkeit einer Entstehung aus Mitochondrien möchte ich aber nicht

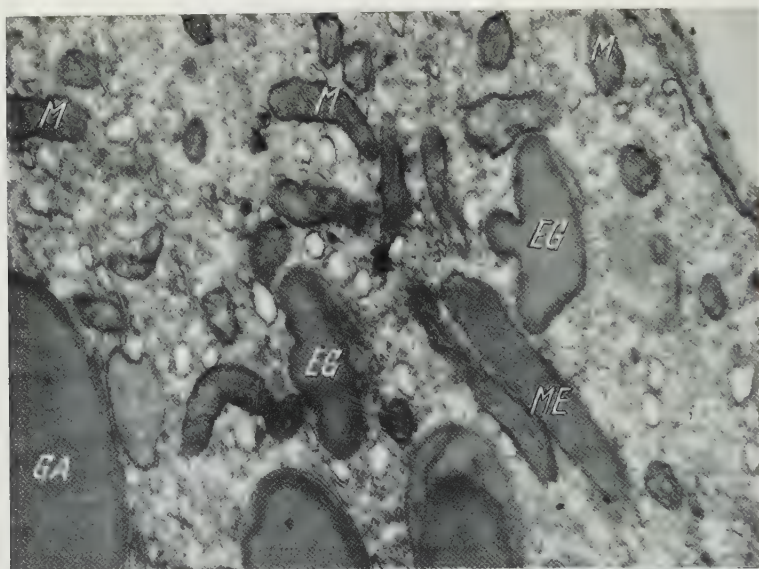


Abb. 8

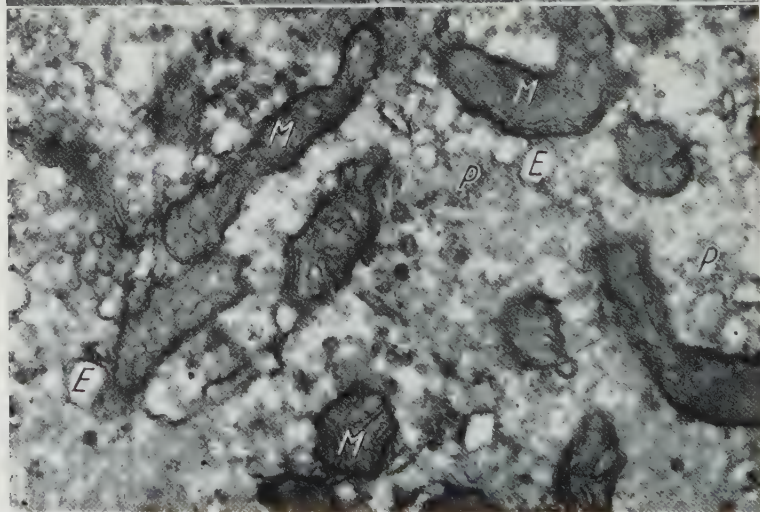


Abb. 9

Abb. 8. Ausschnitt aus einer Nervenzelle, Pedalganglion (s. Text). *M* Mitochondrien; *ME* mitochondrienartiger Einschußkörper, dessen Inhalt weitgehend homogen erscheint; *EG* längliche Einschußkörper, die im Aufbau mehr den Grana I (Typ A) gleichen; *GA* Grana I (Typ A).

Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 20000:1

Abb. 9. Mitochondrien (*M*), endoplasmatisches Reticulum (*E*) und Palade-Granula (*P*) im Pericaryon einer Nervenzelle, Pedalganglion. Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 32000:1

unerwähnt lassen. Gelegentlich findet man nämlich Mitochondrien, die innen zum Teil homogen erscheinen, aber noch deutliche Cristae erkennen lassen (Abb. 8). Daneben gibt es Einschußkörper, meist etwas größer als die Mitochondrien, die



wie diese eine äußere Doppelmembran aufweisen, im übrigen aber vorwiegend homogen sind. Sie liegen in unmittelbarer Nähe der homogenen Grana vom Typ A, so daß eine Beteiligung der Mitochondrien an der Genese dieser Einschlußkörper nicht ausgeschlossen ist.

Die normalen *Mitochondrien* (Abb. 8, 9) sind von länglicher Gestalt. Ihre Länge beträgt etwa  $1\ \mu$ , seltener bis zu  $2\ \mu$ . Die Cristae verlaufen schräg oder längs zur Oberfläche; letztere ist unregelmäßig gestaltet. Der *Kern* (Abb. 6) ist von einer Doppelmembran mit Poren umgeben. Der *Nucleolus* liegt meist zentral, gelegentlich aber auch dicht an der Kernmembran. Er ist membranlos und zeigt einen geschichtet-granulären Aufbau. Das *endoplasmatische*

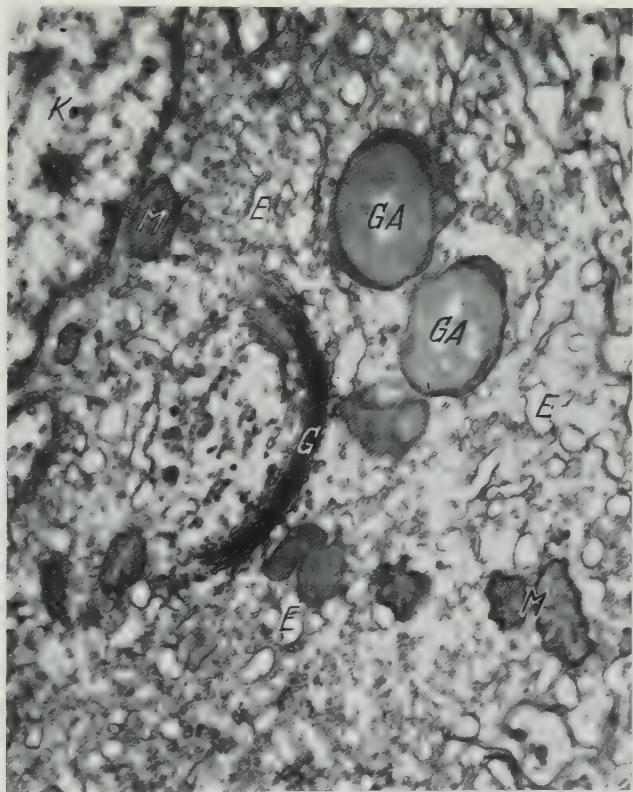


Abb. 10. Golgi-Apparat (G) im Pericaryon einer Nervenzelle, Pedalganglion. K Kern, M Mitochondrien, E endoplasmatisches Reticulum, GA Grana I. Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 16000:1

*Reticulum* (Abb. 9—11) durchzieht — teils eng-, teils weitlumig — das Grundplasma der Zelle. Es handelt sich um ein agranuläres Reticulum, da die *Palade-Granula* (RNS-Granula, Ribosomen) größtenteils diffus oder in kleinen Gruppen gehäuft im Grundplasma vorkommen (Abb. 9). Dies entspricht dem lichtmikroskopischen Befund der sehr fein verteilten Nissl-Substanz. In den Nervenzellen findet man an mehreren Stellen *Golgi-Apparate* (Abb. 10). Sie bestehen aus einer Anzahl von Doppelmembranen (meist 5) in geschichteter Lagerung, deren Profile verschieden stark gekrümmt sein können. In der Nachbarschaft liegen die typischen kleinen Golgi-Vesikel. *Neurofilamente* sind in den Nervenzellen nur schwach und undeutlich zu erkennen, einwandfrei aber in den abgehenden Axonen (Abb. 11). Die parallele Längsausrichtung der Filamente an diesen Stellen erleichtert ihr Auffinden in Ultradünnschnitten. Die in der Literatur als *Fetttröpfen* beschriebenen Einschlußkörper finden sich gelegentlich in den Nervenzellen, allerdings immer in sehr geringer Zahl (Abb. 12).

## II. Gliazellen

a) Lichtmikroskopische Ergebnisse. In der Nervenzellschicht liegen die spindelförmigen Gliazellen (Abb. 4a) in kleinen Gruppen zwischen den Nervenzellen;

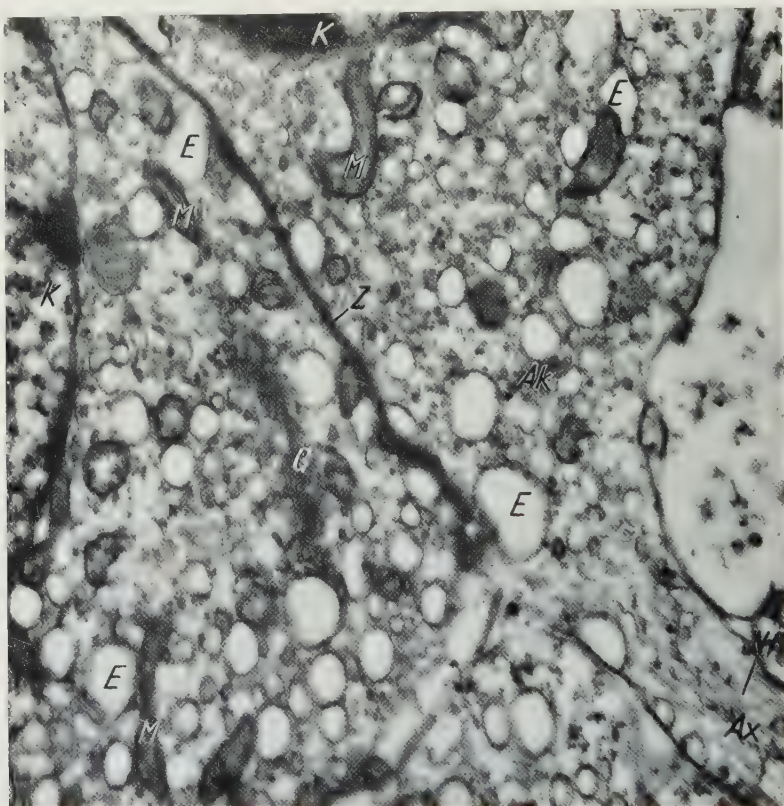


Abb. 11

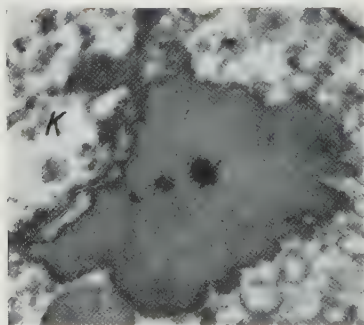


Abb. 12

Abb. 11. Ausschnitt aus zwei Nervenzellen, Pedalganglion. Ein Achsenfaserkonus (Ak) mit Axon (Ax) ist längsgeschnitten. K Kern, M Mitochondrien, E endoplasmatisches Reticulum, G Golgi-Apparat, Nf Neurofilamente, Z Zellmembran.

Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 16000:1

Abb. 12. Fetttropfen in einer Nervenzelle.

K Kern. Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 20000:1

sie besitzen einen länglichen Kern mit einem kleinen, oft schlecht zu erkennenden Nucleolus. Alle Zellen in der zentralen Fasermasse gehören der Glia an (BOCHENEK 1905). Hier fallen sie durch ihre verschiedenartig gestalteten Kerne auf. Die Zellkerne können spindelförmig, aber auch rund oder kappenförmig sein.

Wegen der geringen Ausbildung von Cytoplasma sind Einschlüsse in den Gliazellen schwer zu beurteilen. Innerhalb der *Nervenzellschicht* lassen sich an gün-



stigen Längsschnitten durch Gliazellen gelegentlich feinste Grana nachweisen, die in susa- oder bouin-fixiertem Material gleiche Farbreaktionen wie die Grana I zeigen (Paraldehydfuchsin: rotviolett, Chromhämatoxylin: grau), jedoch mit der Ausnahme, daß sie auch nach Champy-Fixierung nicht sudanophil sind. In der zentralen *Fasermasse* finden sich — allerdings nicht sehr häufig — im Verlaufe von Faserzügen feine Grana. Da die Fasern hier in stärkerem Maße quer und schräg geschnitten sind, werden bei dem geringen Durchmesser der Gliazellfortsätze Grana auf Querschnitten kaum auffallen. Zu stärkeren Sekretansamm-

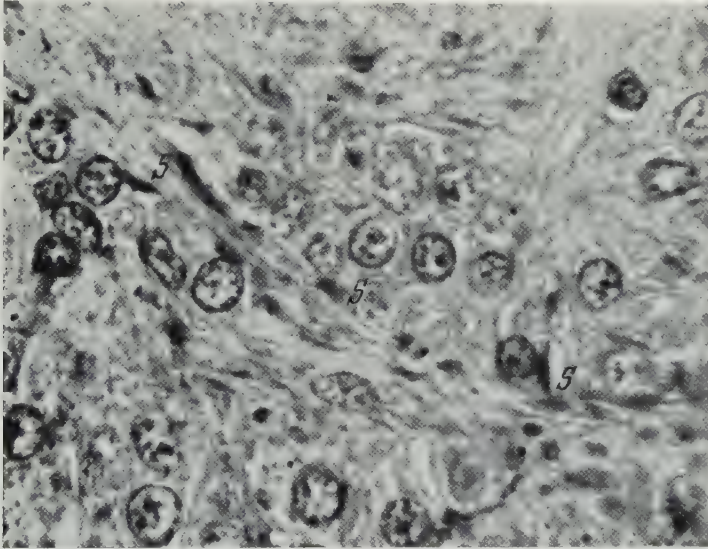


Abb. 13. Sekretansammlungen (S) im peripheren Teil der zentralen Fasermasse, Pedalganglion. Susa, Paraldehydfuchsin. Vergr. 1200:1

lungen kommt es dagegen in peripheren Teilen der Fasermasse. In Faserichtung finden sich dort mehr oder weniger homogene Sekretmassen, meist in Form länglicher Schollen (Abb. 13). Manchmal läßt sich in den homogenen Massen eine granuläre Zusammensetzung beobachten. Zur Peripherie hin, besonders in Gebieten abgehender Nerven (bzw. Konnektive oder Kommissuren) nimmt also die Sekretmenge auffallend zu. Kurz vor Verlassen des Ganglions muß es zwangsläufig zu einer Parallelanordnung von Fasern nervöser und gliöser Natur kommen und damit — auf Längsschnitten — zu einer besseren Darstellung von eingelagerten Grana. Die Farbreaktionen sind die gleichen wie sie für die Grana in den Gliazellen der Nervenzellschicht beschrieben wurden. Die Unterscheidung von Nerven- und Gliafasern ist in der zentralen Fasermasse nicht ohne weiteres möglich. Auf Grund des färberischen Verhaltens ist jedoch zu vermuten, daß die Grana in Gliazellfortsätzen liegen. Deutlicher werden diese Verhältnisse beim Studium der abgehenden Nerven und Konnektive (vgl. S. 705).

Es ist kaum anzunehmen, daß die relativ kleinen Gliazellen in der Lage sind, diese Sekretmengen zu produzieren. Auffallend ist das übereinstimmende färberische Verhalten der Grana in den Gliazellen und der Grana I in den Nervenzellen,

wenn man davon absieht, daß das Material in der Glia mit Sudanschwarz nicht mehr darstellbar ist. Unter Berücksichtigung noch zu besprechender Ergebnisse komme ich zu dem Schluß, daß diese Grana ein Ableitungsprodukt der Grana I der Nervenzellen sind. Ich bezeichne diese Neurosekretgrana in der Glia als Grana I.

Die besprochenen Ergebnisse beziehen sich auf das Neurosekret I. Im lichtmikroskopischen Bereich finde ich keinen sicheren Hinweis auf den Verbleib des Neurosekrets II. Erst durch elektronenmikroskopische Untersuchung lassen sich

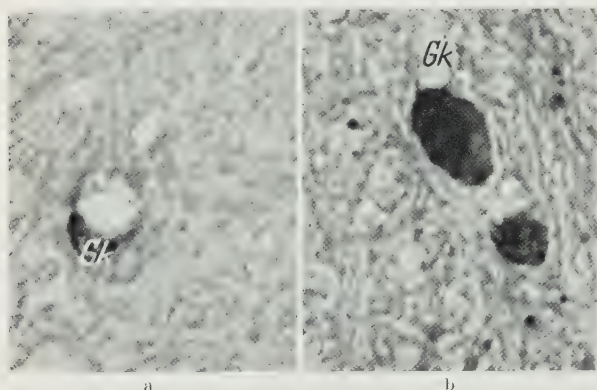


Abb. 14a u. b. Vakuolen in der zentralen Fasermasse, Viszeralganglion. Gk Gliakerne. a Leere Vakuole nach Susa-Fixierung. Paraldehydfuchsin. b Inhalt der Vakuole bleibt nach Champy-Fixierung erhalten. Sudanschwarz. Vergr. 1200:1

Granula nachweisen, die sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit den Grana II stehen (vgl. S. 709).

Auf eine Besonderheit in der *zentralen Fasermasse* muß ich noch hinweisen. Wie besprochen, gehören alle hier auftretenden Zellen zur Glia und besitzen verschiedenartig gestaltete Kerne. In unmittelbarer Nähe der Kerne findet man oft Vakuolen, die zum Teil eine recht ansehnliche Größe erreichen (bis etwa  $10\mu$

Durchmesser). Nach Susa- oder Bouin-Fixierung (Abb. 14a) befinden sich an den Rändern dieser Vakuolen gelegentlich noch Reste eines Materials in Form kleiner, unregelmäßig gestalteter Brocken, die mit Paraldehydfuchsin rotviolett und mit Chromhämatoxylin nur ganz schwach darstellbar sind. Durch die Susa- oder Bouin-Fixierung ist hier Material herausgelöst worden, denn in Präparaten nach Champy-Fixierung und nach Färbung, z. B. mit Sudanschwarz B oder Säurefuchsin, sind die meisten Vakuolen gefüllt (Abb. 14b). In einer homogenen Grundsubstanz befinden sich granuläre oder auch blasige Einschlüsse. Der Vakuoleninhalt erscheint nach Färbung mit Sudanschwarz B graublau (nie schwarz wie die Grana I und II), nach Färbung mit Säurefuchsin lilarot. Die Farbintensität besonders der Einschlüsse kann verschieden sein. Es ist mir nicht möglich, Angaben über die Herkunft dieses Materials und einen etwaigen Zusammenhang mit den neurosekretorischen Vorgängen zu machen.

In Präparaten nach Champy-Fixierung und Sudanschwarz-Färbung enthalten die Gliazellen der Nervenzellschicht und der zentralen Fasermasse (auch der peripheren Nerven, der Konnektive und der Kommissur) vereinzelt noch schwarze Grana, die größer sind als die übrigen in der Glia gefundenen Einschlüsse. Nach Susa- oder Bouin-Fixierung (Färbungen: Paraldehydfuchsin, Chromhämatoxylin oder Sudanschwarz B) finde ich jedoch keine vergleichbaren Grana.

**b) Elektronenmikroskopische Ergebnisse.** Erst das elektronenmikroskopische Bild erlaubt exakte Aussagen über die Grana in den Gliazellen. Untersucht werden aber lediglich Gliazellen aus der Ganglienzellschicht. Die Abb. 15 zeigt den



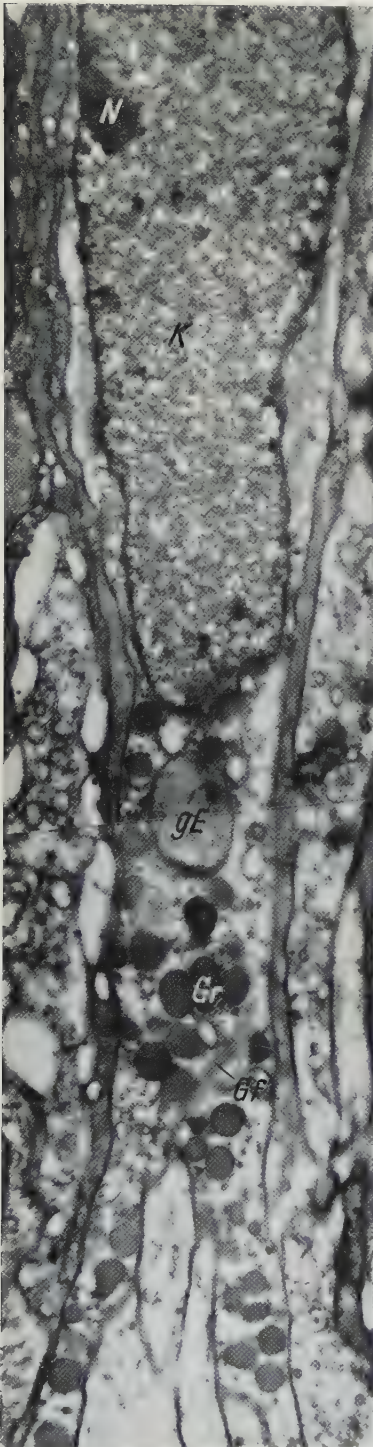


Abb. 15

kernhaltigen Teil einer solchen Zelle aus dem Pedalganglion; im unteren Teil des Bildes gabelt sich der Zellfortsatz. Auffallend ist die große Zahl runder bis ovaler Einschlusskörper von  $0,2-0,4 \mu$  Durchmesser. Sie müssen identisch sein mit den bereits besprochenen Grana 1 in den Gliazellen, da sie in Größe und Häufigkeit mit diesen übereinstimmen. Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen sie

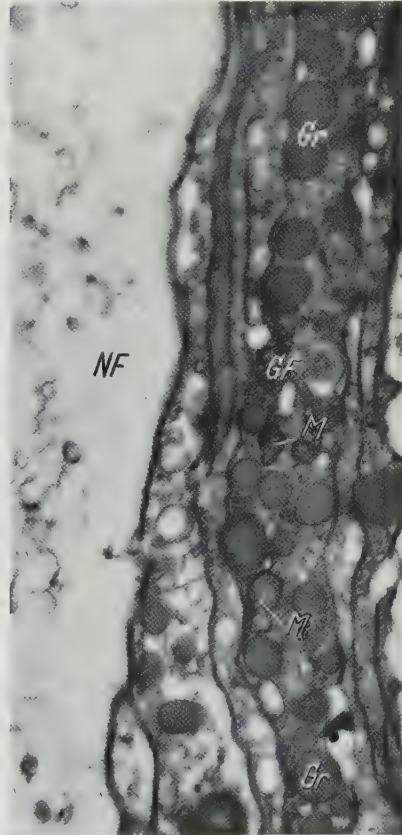


Abb. 16

Abb. 16. Gliafasern (GF) und Nervenfasern (NF), Längsschnitt, Pedalganglion. Gr Grana 1, M Mitochondrien. Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 16000:1

Abb. 15. Teil einer Gliazelle (Längsschnitt) aus der Nerven-Gliazellschicht, Pedalganglion. K Kern, N Nucleolus, Gr Grana 1, gE größerer Einschlusskörper, Gf Gliafilamente. Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 12000:1

homogen und relativ elektronendicht. Nach außen werden sie von einer nicht immer deutlichen Membran begrenzt. Diese Einschlüsse findet man nicht nur in Kernnähe, sondern auch in den Gliazellfortsätzen (Abb. 16).

In weit geringerer Anzahl kommen daneben größere Einschlusskörper vor (Abb. 15), die elektronenoptisch weniger dicht erscheinen als die kleinen Grana 1. Ihre äußere Form ist gleichfalls rundlich bis oval; sie erreichen Durchmesser von etwa  $1.0\text{--}1.5\mu$ . Lichtmikroskopisch entsprechen sie den größeren Grana, die nur nach Champy-Fixierung erhalten bleiben und dann mit Sudanschwarz B

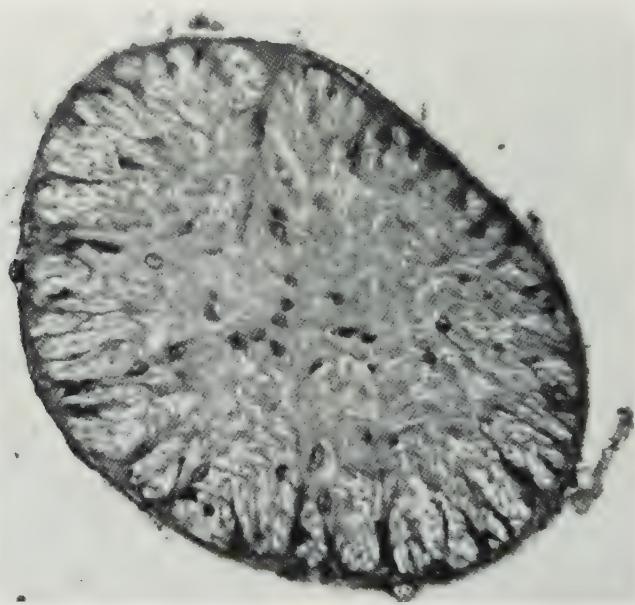


Abb. 17. Cerebropedalkonnectiv, quer. Vom Rande her ziehen Gliazellen mit ihren Fortsätzen septenartig ins Innere. Susa, Paraldehydfuchsin. Vergr. 500:1

darstellbar sind. Elektronenoptisch erscheint ihr Aufbau granulär. Oft enthalten sie elektronendichtere Einschlüsse von runder oder unregelmäßiger Gestalt. Eine geschichtete Anordnung der inneren granulären Bestandteile läßt sich gelegentlich beobachten. Die nach außen begrenzende dunklere Membran kann zum Teil fehlen.

*Mitochondrien* sind in den Gliazellen nicht allzu häufig (Abb. 16). Sie sind meist von etwas gedrungener Gestalt. In Kernnähe findet man manchmal *Golgi-Apparate*. Sie sind ähnlich aufgebaut wie die in den Nervenzellen, durchschnittlich aber etwas kleiner. Schließlich sind noch die *Gliafilamente* (Abb. 15) zu erwähnen. Sie sind sehr zart und lassen sich stellenweise über weite Strecken verfolgen.

#### D. Nerven, Konnektive und Kommissur

a) **Lichtmikroskopische Ergebnisse.** Zur Untersuchung gelangten verschiedene Nerven, die Kommissur, das Cerebropedal- und das Cerebroviszeralkonnectiv, die ich bei der Präparation in einer Länge von etwa  $1.0\text{--}1.5\text{ cm}$  an den Ganglien beließ und die so mit den Ganglien fixiert und gefärbt wurden.



Der *Aufbau* der peripheren Nerven, der Konnektive und der Kommissur stimmt weitgehend überein. Den äußeren Abschluß bildet eine dünne, bindegewebige Hülle, wie sie auch für die Ganglien charakteristisch ist. Innerhalb derselben liegen die Nervenfasern und die langgestreckten Gliazellen mit ihren typischen spindelförmigen Kernen. Die Fortsätze der Gliazellen verlaufen nicht alle in der Längsrichtung der Nerven und Konnektive, denn in Querschnitten sieht man sie auch von der Peripherie septenartig ins Innere ziehen und sich verzweigen (Abb. 17). In größeren Nerven, besonders aber in den Konnektiven

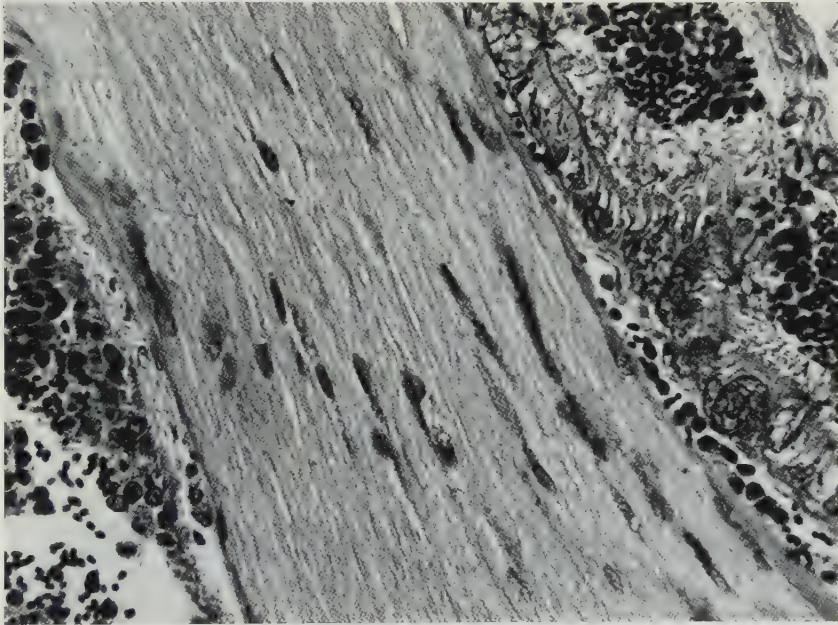


Abb. 18. Cerebropedalkonnektiv, längs. Ansammlungen von Grana I in der Nähe der Gliakerne. Außerhalb des Konnektivs Hodenacini. Susa, Paraldehydfuchsin. Vergr. 500:1

und der Kommissur, findet man gelegentlich Nervenzellen, die Neurosekretgrana I enthalten.

In den abgehenden Nerven, den Konnektiven und der Kommissur kann ich *Neurosekretgrana* nur in den Gliazellen nachweisen. Sie färben sich mit Paraldehydfuchsin rotviolett (Abb. 18), mit Chromhämatoxylin schwach grau und sind nicht sudanophil. Ihr färberisches Verhalten stimmt völlig überein mit dem der Grana I in den Gliazellen der Ganglien. Somit ist die Bezeichnung auch dieser Neurosekretgrana in den Gliazellen der Nerven, Konnektive und Kommissur als Grana I gerechtfertigt. Der Durchmesser der einzelnen Grana beträgt im Mittel  $0,6\mu$ , ist also etwas größer als in den Gliazellen der Ganglien. In den Längsschnitten durch Nerven und Konnektive ist bereits lichtmikroskopisch deutlich erkennbar, daß die Neurosekretgrana I in den Gliazellen und ihren Fortsätzen und nicht in den Nervenfasern liegen. Hier sind die Gliazellen viel häufiger längsgeschnitten als in der zentralen Fasermasse der Ganglien, so daß besonders die Anhäufungen der Grana vor und hinter den langgestreckten Gliakernen ins Auge fallen (Abb. 18).

Neben diesen in größerer Menge auftretenden Grana I findet man seltener sehr feine und oft nur undeutlich zu erkennende Grana, deren Farbe kaum zu beurteilen ist. Ob sie in Nerven- oder Gliafasern liegen, läßt sich lichtmikroskopisch nicht entscheiden. Die elektronenmikroskopischen Befunde sprechen dafür, daß es sich um das in Axonen abgeleitete Neurosekret II handelt (vgl. S. 709).

In champy-fixiertem Material treten auch in den peripheren Nerven, den Konnektiven und der Kommissur in den Gliazellen größere sudanophile Grana auf (Durchmesser zum Teil größer als  $2\mu$ ), wie ich sie bereits in den Gliazellen der Ganglien fand. Auch hier sind sie nach Bouin- oder Susa-Fixierung nicht nachweisbar.

Ganz allgemein kann ich feststellen, daß bei starker Anreicherung in den Konnektiven auch größere Granamengen in den peripheren Nerven zu finden sind. In der Kommissur ist die Granamenge durchweg geringer.

Die stärksten Anreicherungen der Grana I finde ich bei männlichen und weiblichen Muscheln im Frühjahr. In dieser Zeit zeigt sich ebenfalls eine deutliche Mengenzunahme der Neurosekretgrana I in den Ganglienzellen (vgl. S. 695). Vergleicht man aber die Granamenge in den abgehenden Nerven und Konnektiven mit der in den Ganglien, so ist keineswegs immer eine Übereinstimmung in der Granamenge festzustellen. Bei starker Anreicherung in den Nerven können die Ganglienzellen weitgehend leer sein, eine mittlere Granamenge enthalten oder auch stark mit Sekret beladen sein. Somit können bei starker Ableitung des Neurosekrets durch die Nerven und Konnektive die Ganglienzellen unterschiedliche Funktionszustände aufweisen: Entleerung, schwache oder starke Produktion. Dieser Unterschied in der Granamenge ist in der übrigen Zeit des Jahres zwar auch vorhanden, aber sehr viel schwächer als im Frühjahr.

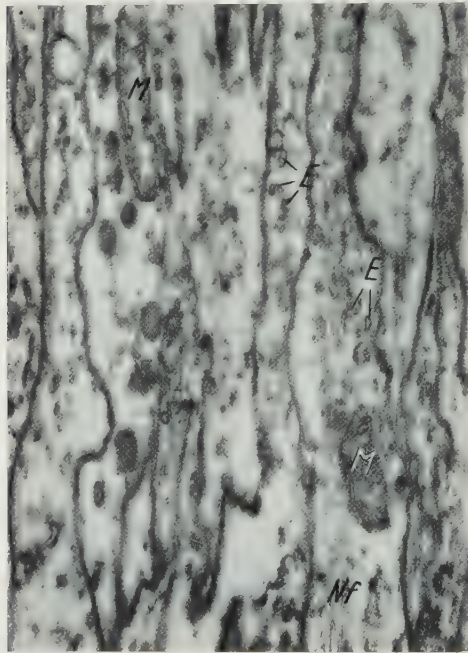


Abb. 19. Längsgeschnittene Axone im Cerebropedalkonnektiv. M Mitochondrien, E endoplasmatisches Reticulum, Nf Neurofilamente. Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 20 000:1

Die starken Neurosekretanreicherungen und ihre größeren Schwankungen sprechen für eine vermehrte Produktion und Ableitung im Frühjahr. Da in dieser Zeit auch die Fortpflanzung von *Unio tumidus* stattfindet, wäre ein Zusammenhang mit dem Sexualzyklus zu vermuten, wie ihn z.B. LUBET (1955a, 1955b, 1956) bei *Mytilus edulis* und *Chlamys varia* beschrieb. Einen scharfen Schnitt wird man bei *Unio tumidus* jedoch nicht erwarten können, da sich die Fortpflanzungsperiode dieser Art über mehrere Monate (März—Mai) erstreckt.



Ein Vergleich der Sekretmengen in Ganglienzellen und peripheren Nerven mit der Gametenreife ergibt keinen direkten Zusammenhang. Ob das Neurosekret in den Sexualzyklus eingreift, bleibt also ungeklärt.

**b) Elektronenmikroskopische Ergebnisse.** Elektronenmikroskopisch untersuchte ich Teile des Cerebropedalkonnektivs, verschiedener Pedalnerven und des Nervus superficialis pedis maior, eines Nebenastes des Cerebropedalkonnektivs (Untersuchungsbereich etwa 1 cm vom Pedalganglion entfernt). Das Material stammt von vier verschiedenen Tieren aus den Monaten März und April. Zur Auswertung gelangten 500 Aufnahmen.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Nerven oder Konnektiven sind die Gliazellen

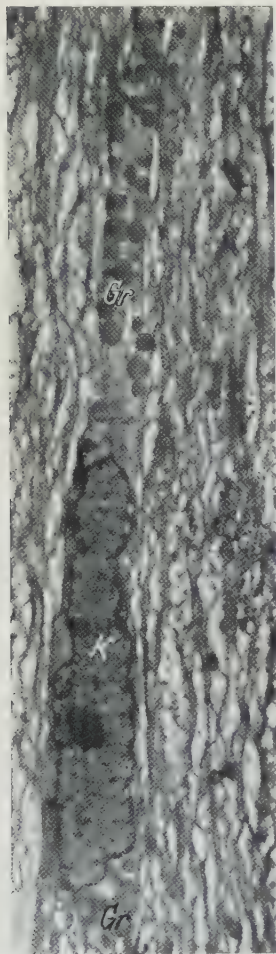


Abb. 20

Abb. 20. Gliazelle mit Kern (K) und Ansammlungen von Grana 1 (Gr), Cerebropedalkonnektiv, längs. Elektronenmikrosk. Vergr. 2800:1, Endvergr. 5600:1

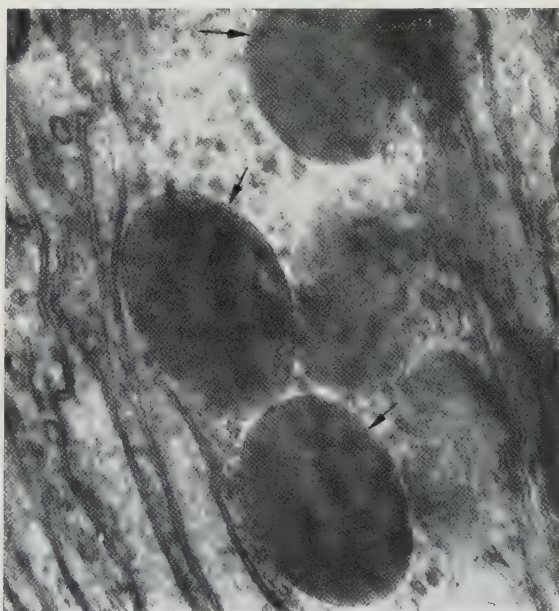


Abb. 21

Abb. 21. Grana 1 in einer Gliazelle des Cerebropedalkonnektivs, Längsschnitt. ↗ Doppelmembranen. Elektronenmikrosk. Vergr. 20 000:1, Endvergr. 50 000:1

mit ihren länglichen Kernen und den verschiedenen Einschlußkörpern leicht zu identifizieren. Sie erscheinen durch das elektronendichtere Grundplasma dunkler als die Nervenfasern. Diese besitzen in der Regel nur feinste Neurofilamente, ein sehr feinumliges endoplasmatisches Reticulum und längliche Mitochondrien (Abb. 19).

Die Gliazellen enthalten — besonders in Kernnähe — viele Grana, die in der Größe mit den lichtmikroskopisch beschriebenen *Grana 1* übereinstimmen (Abb. 20—22). Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man, daß diese Einschluß-

körper von einer Doppelmembran umgeben sind (Abb. 21). Hin und wieder beobachtet man aber auch Einschlüsse, denen die Doppelmembran an einigen Stellen fehlt und deren Inhalt sich mit dem Grundplasma vermischt (Abb. 21).

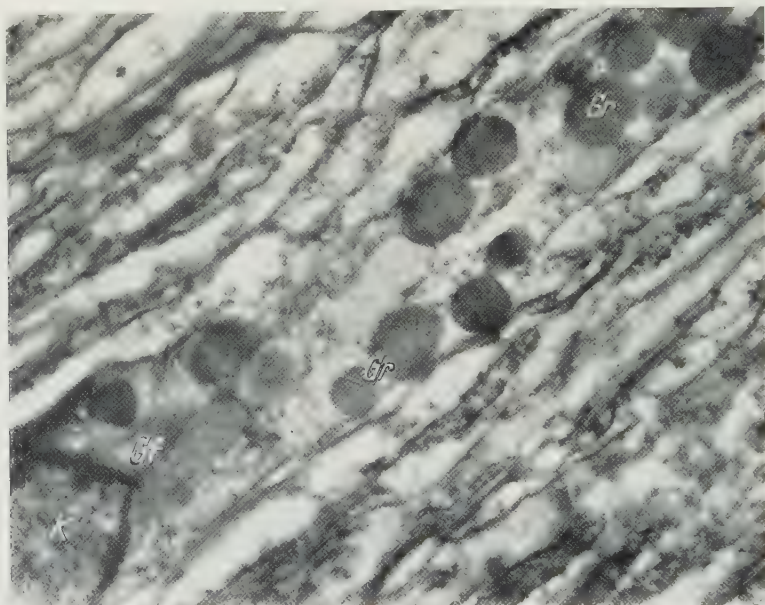


Abb. 22. Teil einer Gliazelle des Cerebropedalkonnektivs, Längsschnitt. K Kern, Gr Grana 1, Gf Gliafilamente. Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 16000:1

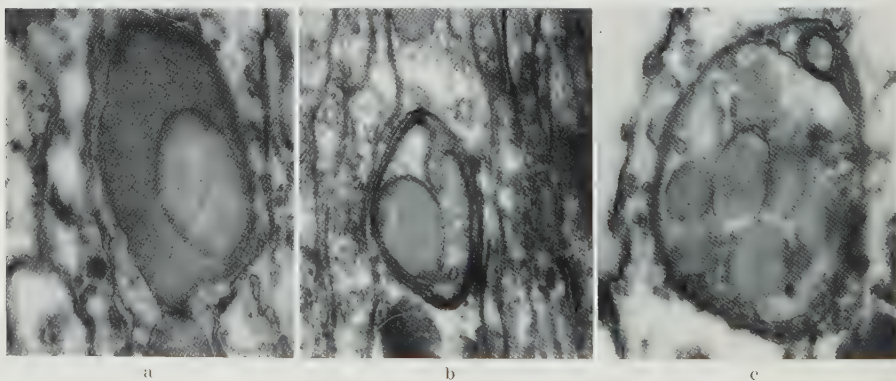


Abb. 23a—c. Zusammengesetzte Einschlußkörper in Gliazellen, Cerebropedalkonnektiv, längs. Elektronenmikrosk. Vergr. 20000:1

Im Aufbau gleichen diese Grana durchaus denjenigen in den Gliazellen der Ganglien, sind aber in den Nerven und Konnektiven etwas größer ( $0,4\text{--}0,6\mu$  Durchmesser).

Neben diesen Grana 1, die in großer Anzahl vorkommen, findet man in den Gliazellen gelegentlich auch größere Einschlußkörper (Abb. 23). Ihr Durchmesser liegt durchschnittlich bei  $1\text{--}2\mu$ , zum Teil auch über  $2\mu$ . Sie sind von rundlicher bis ovaler Gestalt und haben immer den Charakter eines zusammengesetzten



Einschlußkörpers, der von Membranen umgeben ist, häufig aber auch Membransysteme im Inneren aufweist. Das eingeschlossene Material ist recht verschiedenartig; teils erscheint es äußerst feingranulär, teils ziemlich grobgranulär. Ähnliche Grana habe ich auch in den Gliazellen der Ganglien gefunden. In beiden Fällen dürfte es sich um die großen sudanophilen Grana handeln, die lichtmikroskopisch nur nach Champy-Fixierung nachweisbar sind.

*Mitochondrien* sind in den Gliazellen der peripheren Nerven und Konnektive nicht allzu häufig. Sie weichen vom normalen Typ stärker ab und zeigen eigenartige Verschmelzungen und Hakenbildungen. Oft erscheint ihr Inhalt mehr oder weniger aufgelöst (Abb. 24). Wie in den Gliazellen der Ganglien kommen auch hier nur gelegentlich *Golgi-Apparate* vor (Abb. 25). Sie zeigen einen geraden oder unregelmäßig gebogenen Verlauf ihrer Doppelmembranen. Die *Gliafilamente* (Abb. 22, 27) bilden feinere, häufig aber auch stärkere Fibrillen.

Neben den Grana 1 findet man innerhalb von Fasern in viel geringerer Häufigkeit kleinere Grana (0,12 bis  $0,25\mu$  Durchmesser), die in ihrem Aufbau und ihrer Größe den „*Elementargranula des Neurosekrets*“ (BARGMANN, KNOOP und THIEL 1957b) gleichen (Abb. 27, 28). Ihre Form ist rundlich, oft auch unregelmäßig, ihre Innenstruktur kann verschiedenartig ausgebildet sein. Um einen inneren, ziemlich elektronendichten und relativ homogenen Kern liegt ein schmaler, heller Hof, der wiederum von einer dunklen Membran umgeben ist. Daneben findet man Granula, deren elektronendichtes Zentrum sich mehr oder

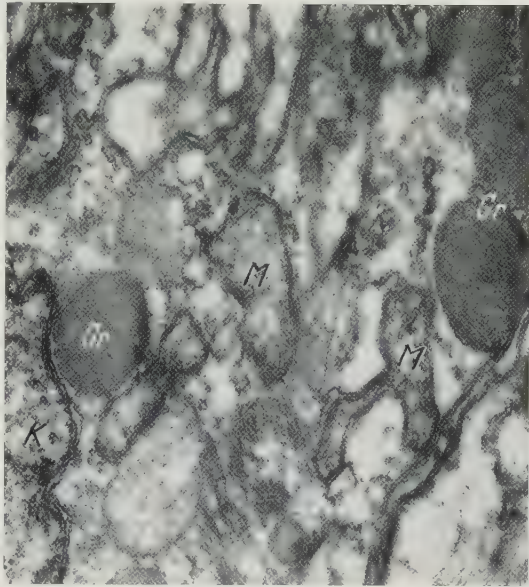


Abb. 24. Mitochondrien (M) in einer Gliazelle, Cerebropedalkonnektiv, längs. K Kern, Gr Grana 1. Elektronenmikrosk. Vergr. 20 000:1, Endvergr. 30 000:1

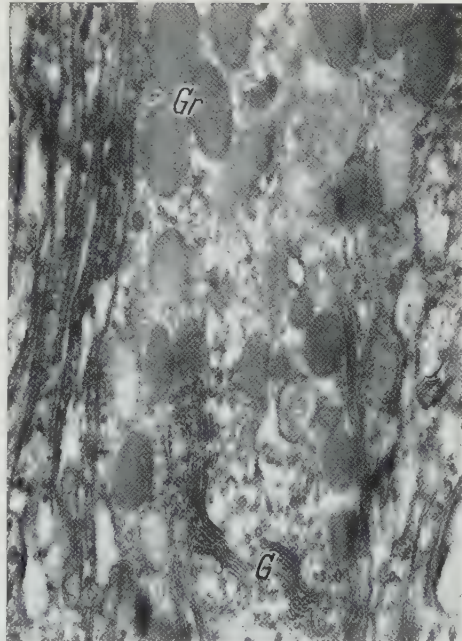


Abb. 25. Golgi-Apparat (G) in einer Gliazelle, Cerebropedalkonnektiv, längs. Gr Grana 1. Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 20 000:1

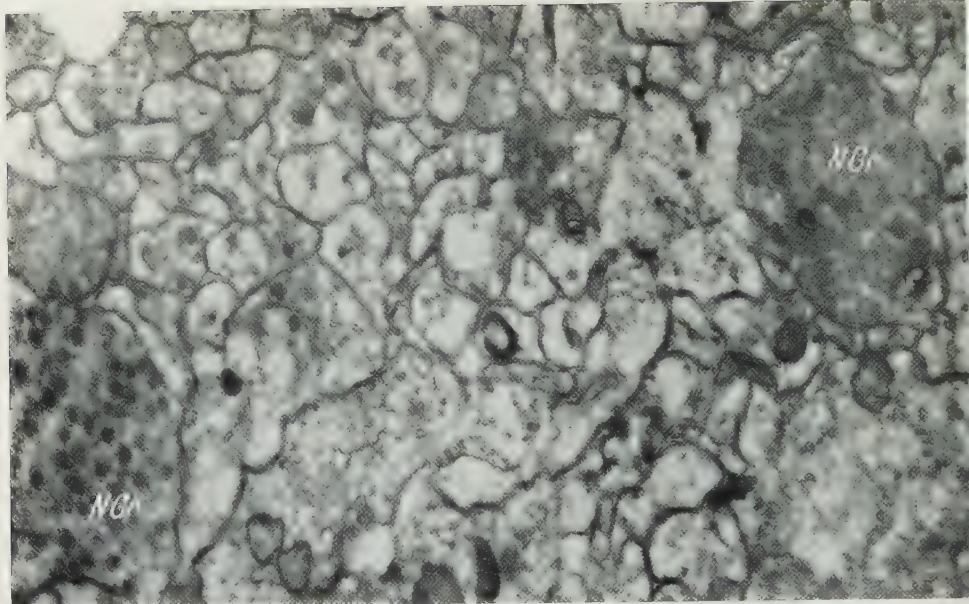


Abb. 26. Axone (quer) mit neurosekretorischen Granula (NGr) im Cerebralganglion.  
Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 20 000:1

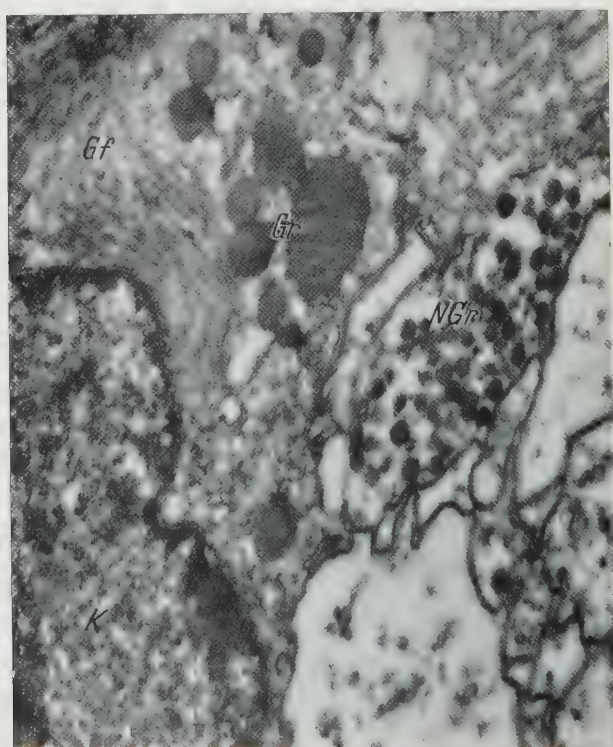


Abb. 27



Abb. 28

Abb. 27. Teil eines Querschnitts durch den Nervus superficialis pedis maior. Links Teil einer Gliazelle mit Kern (K), Grana 1 (Gr) und Gliafilamenten (Gf). Rechts Axone. Neurosekretorische Granula (NGr). Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 20 000:1

Abb. 28. Axonlängsschnitt mit neurosekretorischen Granula, Cerebropedalkonnektiv.  
Elektronenmikrosk. Vergr. 8000:1, Endvergr. 20 000:1



weniger aufgelockert hat, wobei lamellenartige Innenstrukturen sichtbar werden. Schließlich kann der Inhalt weitgehend aufgelöst sein oder ganz fehlen, so daß nur noch die äußere Membran vorhanden ist. Da ich diese Granula nie in Fasern nachweisen kann, die einwandfrei gliöser Natur sind, muß ich annehmen, daß sie *innerhalb von Axonen* liegen. Auch in den Ganglien lassen sich Axone mit neurosekretorischen Granula nachweisen (Abb. 26). Ihr Durchmesser beträgt dort 0,10–0,12  $\mu$ . Mitochondrien kommen in den granulaführenden Axonen relativ selten vor.

Die Kleinheit der Neurosekretgranula und ihre zum Unterschied von Grana I viel geringere Häufigkeit sprechen dafür, daß es sich hier um das *abgeleitete Neurosekret II* handelt. Bei der Besprechung der lichtmikroskopischen Ergebnisse wurde bereits betont, daß die Ganglienzellen mit Neurosekret II nur selten auftreten und daß das Sekret außerhalb der Nervenzellen nie sicher nachweisbar ist. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben also ergeben, daß die beiden Neurosekrettypen auf verschiedene Art abgeleitet werden: Neurosekret I in den Gliazellen und Neurosekret II in den Axonen.

### E. Diskussion

Über die Neurosekretion bei den Lamellibranchiaten existieren nur die Arbeiten von GABE (1955) und LUBET (1955a, 1955b, 1956). GABE untersuchte 20 marine Muschelarten und konnte bei allen eine neurosekretorische Tätigkeit nachweisen. Wie LUBET, der mit *Mytilus edulis* und *Chlamys varia* arbeitete, fand er nur in den Cerebral- und Viszeralganglien neurosekretorische Zellen. Bei *Unio tumidus* kann ich aber *auch im Pedalganglion* solche Zellen nachweisen. LUBET und GABE fanden die neurosekretorischen Zellen in den Cerebralganglien nur in den oralen und dorsalen und in den Viszeralganglien in den dorsalen Gebieten. Eine derartige charakteristische Lage innerhalb der Ganglien kann ich bei *Unio tumidus* nicht feststellen. Die neurosekretorischen Zellen mit den Grana I sind hier völlig gleichmäßig über alle Ganglien verteilt. Lediglich die Zellen mit den Grana II, die nur in geringer Zahl vorkommen, zeigen eine schwache Tendenz zu dorsaler Lage. Im Viszeralganglion findet man sie in den proximalen und distalen Gebieten häufiger, dagegen in den lateralen gar nicht. Eine Ausbildung bestimmter Areale von neurosekretorischen Zellen, wie sie für viele Wirbellose charakteristisch ist (GABE 1954, E. und B. SCHARRER 1954), gibt es bei *Unio tumidus* also nicht. Es sind vielmehr fast alle Ganglienzellen neurosekretorisch tätig (Grana I). Ähnliche Verhältnisse wurden bisher nur bei einigen Gastropoden beschrieben (bei *Cylichna*, LEMCHE 1956; bei *Ferrissia*, LEVER 1957; bei *Helix*, KRAUSE 1960).

Bei wirbellosen Tieren unterscheiden die meisten Autoren verschiedene Typen von neurosekretorischen Zellen nach Form und Größe oder unterschiedlicher Ausbildung der Sekretgrana (Färbbarkeit, Größe usw.). Eine Unterscheidung von Zelltypen nur nach morphologischen Gesichtspunkten, wie sie LUBET (1955a) bei *Mytilus* und *Chlamys* durchführte, erscheint mir bei *Unio tumidus* nicht möglich, da Zellen verschiedenster Form und Größe Neurosekret I bilden. Die von mir vorgenommene Einteilung in zwei Typen beruht dagegen auf *färberischen Unterschieden der Sekrete*: Grana I nach Susa- oder Bouin-Fixierung vakuolisiert,

Granareste mit Paraldehydfuchsin rotviolett, mit Chromhämatoxylin grau darstellbar, sudanophil; nach Champy-Fixierung Grana vollständig erhalten und sudanophil. *Grana II* nach Susa- oder Bouin-Fixierung vollständig erhalten, mit Paraldehydfuchsin intensiv rotviolett, mit Chromhämatoxylin tief schwarzblau darstellbar, sudanophil. Diese beiden Neurosekrete unterscheiden sich außerdem noch in der Häufigkeit ihres Auftretens in den Ganglien (s. oben). Bei einigen Gastropoden wurde auch auf färberische Unterschiede (bei *Pleurobranchaea*, B. SCHARRER 1935, 1937; bei *Ferrissia*, LEVER 1957) und auf Größendifferenzen der Sekretgrana hingewiesen (bei *Helix*, KRAUSE 1960). Der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten wird aber dadurch erschwert, daß oft verschiedene Färbemethoden zur Anwendung kamen.

Die bei *Unio tumidus* gefundene starke *Sudanophilie* der *Neurosekrete* deutet darauf hin, daß größere Fett- oder Lipoidmengen vorhanden sind. Die Grana I müssen leichter (nach Bouin- und Susa-Fixierung herausgelöst) und schwerer lösliche Fette enthalten. LUBET (1955a) betonte, daß das Neurosekret von *Chlamys* und *Mytilus* keine Affinität zu Fettfarbstoffen besitzt. GRZYCKI (1951) fand gleichfalls bei den Gastropoden *Limnaea*, *Planorbis* und *Paludina* in dem „probable neurosecretory material“ weder Fett noch fettähnliche Substanzen. Dagegen wiesen bei einigen Insekten BROUSSE u. Mitarb. (1958, *Blabera fusca*) und REHM (1955, verschiedene Lepidopteren) im Neurosekret Lipoproteide nach. Möglicherweise sind bei *Unio tumidus* die Lipoide Trägersubstanzen für das Neurosekret, da bei der Ableitung des Sekrets die Sudanophilie verlorengelht. Die Möglichkeit einer Verankerung des Neurosekrets in der Zelle durch Lipoide wurde bei Wirbeltieren beschrieben (SLOPER 1954, 1955, *Hund*, *Katze*). Eine histochemische Untersuchung der Neurosekrete bei *Unio tumidus* ging über den Rahmen meiner Arbeit hinaus.

Über die *Genese* des *Neurosekrets* von *Unio tumidus* kann ich keine eindeutigen Aussagen machen. Meine elektronenmikroskopischen Befunde deuten zwar darauf hin, daß das Neurosekret I mitochondrialen Ursprungs sein könnte (vgl. S. 698). LACY und HORNE (1956, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen) beschrieben in Nervenzellen bei *Patella* (Gastropoda) eine aktiv sekretorische Zone, in der Golgi-Apparat, Mitochondrien und „Prolipochondrien“ liegen. Die „Prolipochondrien“ sollen aus Mitochondrien entstehen und Vorstufen der „Lipochondrien“ sein. Die Verfasser deuten die „Lipochondrien“ als sekretorische Produkte der Nervenzellen. BARGMANN und KNOOP (1957a) haben ebenfalls die Möglichkeit eines mitochondrialen Ursprungs des Neurosekretes diskutiert. Eine Beteiligung der Nissl-Substanz, wie sie GABE (1955) bei den von ihm untersuchten Muscheln fand, ist bei *Unio tumidus* schwer zu beurteilen, da infolge der sehr feinen Verteilung innerhalb des Cytoplasmas keine mengenmäßigen Unterschiede zu erfassen sind. Auch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergeben keine Anhaltspunkte dafür, daß die Palade-Granula an dem Aufbau der Neurosekretgrana beteiligt sind. Eine Mitwirkung des Golgi-Apparates bei der Genese des Neurosekrets ist aus meinen elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zu ersehen. Die bei einigen Gastropoden beschriebene starke Oberflächenvergrößerung der Kerne in den neurosekretorisch tätigen Zellen (LEVER 1957, KRAUSE 1960) tritt bei *Unio tumidus* nicht auf.



Bei *Unio tumidus* erfolgt die *Ableitung des Neurosekrets* in den peripheren Nerven und den Konnektiven. GABE (1955) und LUBET (1955a) konnten bei den von ihnen untersuchten Muscheln die Neurosekretgrana lediglich ein kurzes Stück in den abgehenden Axonen, nicht aber in den Nerven und Konnektiven nachweisen. Dagegen wurde bei Gastropoden ein Transport in den peripheren Nerven beschrieben (LEMICHE 1956, LEVER 1957, HERLANT-MEEWIS und VAN MOL 1959, KRAUSE 1960). Die Ableitung des Neurosekrets aus den Ganglienzellen erfolgt bei *Unio tumidus* auf zwei verschiedenen Wegen: einmal über Gliazellen, zum anderen innerhalb von Axonen.

Die *Neurosekretgrana I* müssen bereits innerhalb der Ganglien an Gliazellen weitergegeben werden. Dabei verlieren sie ihre Sudanophilie und nehmen an Größe ab (Grana I). In den Nervenzellen kann ich die Grana nur bis in den Achsenfaserkonus nachweisen. Obwohl ich den Übertritt in die Gliazellen nicht direkt beobachten konnte, lassen die Menge der Grana I in den Gliazellen der Ganglien, Nerven, Konnektive und Kommissur und die starke Übereinstimmung in der Färbbarkeit zwischen diesen Grana und dem Neurosekret I in den Ganglienzellen keine andere Ableitungsmöglichkeit zu. Weiterhin zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Nerven und Konnektiven größere Sekretansammlungen in den Gliazellen. Eine gliöse Leitung von Neurosekret wurde bisher nur bei *Helix* (KRAUSE 1960) vermutet.

Die Ableitung der *Neurosekretgrana II* muß *innerhalb der Axone* erfolgen. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen ergeben zwar dafür keine exakten Anhaltspunkte. Die elektronenmikroskopischen Befunde zeigen, daß die abgeleiteten Grana so klein sind, daß sie lichtmikroskopisch kaum auflösbar sind ( $0,10\text{--}0,25\ \mu$  Durchmesser). Diese Granula findet man nicht sehr häufig; sie kommen aber sowohl in Axonen innerhalb der Ganglien, als auch der Nerven und Konnektive vor. Ihre sublichtmikroskopische Struktur und Größe stimmen auffällig überein mit den bei Wirbeltieren (u.a. PALAY 1955, 1957, BARGMANN u. Mitarb. 1957a, 1957b) und Arthropoden (MEYER und PFLUGFELDER 1958, HODGE und CHAPMAN 1958, KNOWLES 1960, SCHULTZ 1960, WILLEY und CHAPMAN 1960) beschriebenen neurosekretorischen Granula. Die von BARGMANN und KNOOP (1957a) erwähnte Variabilität der Granainnenstruktur kann man bei *Unio tumidus* ebenfalls beobachten. Derartige Granula wurden bei allen untersuchten Tieren nur innerhalb von Axonen gefunden. Auch bei *Unio tumidus* sind sie nie in Gliazellen festzustellen. Daß es sich hier um Ableitungsprodukte der Grana II der Ganglienzellen handeln muß, folgt aus der parallel auftretenden geringen Häufigkeit der Neurosekretgrana II und der Granula in den Axonen. Im Gegensatz dazu findet man die Grana I in den Nervenzellen und ihre Ableitungsprodukte in den Gliazellen in sehr viel größeren Mengen.

Über die *Funktion des Neurosekrets* bei Mollusken liegen bislang nur wenige Untersuchungen vor. Am häufigsten wurde ein Zusammenhang zwischen Neurosekretion und Sexualzyklus gefunden (GABE 1954, LUBET 1955a, 1955b, 1956, HERLANT-MEEWIS und VAN MOL 1959). So behauptet LUBET (1955b, 1956), daß *Mytilus* und *Chlamys* erst nach Ausschüttung des Neurosekrets aus den Cerebralganglien auf Reize von außen reagieren, die die Abgabe der Geschlechtsprodukte bewirken. Bei *Unio tumidus* konnte ich zwar auch im Frühjahr, also zur Fortpflanzungszeit, die stärksten Neurosekretanreicherungen in den Ganglienzellen

und in den Nerven und Konnektiven feststellen, doch geben die vergleichenden Untersuchungen der Gonaden keine Anhaltspunkte dafür, ob die Neurosekrete in den Sexualzyklus eingreifen. Auch der Vergleich der Sekretmenge in den Gehirnen im Verlaufe des Jahres ließ keine Rückschlüsse auf die Funktion des Sekrets zu. Es wäre denkbar, daß die starke Produktion von Neurosekret während der Frühjahrsmonate lediglich eine allgemeine Stoffwechselsteigerung hervorruft (KRAUSE 1960). Eine endgültige Aussage ist erst von weiteren experimentellen Untersuchungen zu erwarten.

### Zusammenfassung

1. Fast alle Nervenzellen von *Unio tumidus* sind neurosekretorisch tätig; eine Ausbildung von Arealen im Nervensystem kann nicht beobachtet werden. Erstmals werden sekretorisch tätige Nervenzellen innerhalb des *Pedalganglions* bei Lamellibranchiaten beschrieben.

2. Zwei Typen von Neurosekret lassen sich unterscheiden: 1. Grana I (Neurosekret I) sind in fast allen Nervenzellen nachzuweisen und erscheinen nach Paraldehydfuchsin-Färbung rotviolett, nach Chromhämatoxylin-Phloxin grau; Grana-durchmesser  $1,2\text{--}5\mu$ . Diese Grana erscheinen nach Behandlung mit nichtfett-schonenden Fixiermitteln vakuolisiert. 2. Grana II (Neurosekret II) finden sich in nur wenigen kleineren und mittelgroßen Nervenzellen aller Ganglien. Sie sind mit Paraldehydfuchsin intensiv rotviolett, mit Chromhämatoxylin-Phloxin tief schwarzblau darstellbar; Grana-durchmesser  $0,6\text{--}1,2\mu$ . Grana I und II innerhalb der Nervenzellen zeigen starke Sudanophilie.

3. Die Grana I zeigen elektronenmikroskopisch zwei verschiedene Entwicklungsstufen: Typ A mit relativ homogenem Inhalt, Typ B mit verschiedenen großen Einschlüssen. Nervenzellen mit Grana II, die nur in sehr geringer Anzahl auftreten, wurden elektronenmikroskopisch nicht gefunden.

4. Eine Beteiligung des Kerns oder der Nissl-Substanz an der Bildung des Neurosekrets kann nicht beobachtet werden. Elektronenmikroskopische Befunde deuten auf eine Beteiligung der Mitochondrien hin.

5. Die Ableitung der Neurosekrete erfolgt auf zwei Wegen: die Grana I werden über das Gliagewebe, die Grana II über die Axone abgeleitet. Außerhalb der Nervenzellen zeigen die Neurosekrete keine Sudanophilie.

6. Das Neurosekret in den Gliazellen erscheint im elektronenmikroskopischen Bild in Form rundlicher bis ovaler Grana (Durchmesser  $0,2\text{--}0,4\mu$  innerhalb der Ganglien,  $0,4\text{--}0,6\mu$  Durchmesser in abgehenden Nerven und Konnektiven). Das Neurosekret in den Axonen findet man innerhalb der Ganglien, Nerven und Konnektive. Sein sublichtmikroskopischer Aufbau stimmt mit dem der neurosekretorischen Granula überein, die bei Wirbeltieren und Arthropoden beschrieben wurden (Durchmesser der Granula bei *Unio*  $0,10\text{--}0,25\mu$ ).

7. Eine stärkere Produktion und Ableitung des Neurosekrets I findet man im Frühjahr. Vergleiche der Sekretmenge mit der Gametenreifung ergeben aber keine klaren Zusammenhänge. Das Neurosekret II zeigt nur geringe quantitative Unterschiede im Jahresablauf.

8. Nach Champy-Fixierung lassen sich in Gliazellen der Ganglien und der abgehenden Nerven, der Konnektive und der Kommissur vereinzelt sudanophile Grana nachweisen, deren Durchmesser bei  $1\text{--}2\mu$  liegt, gelegentlich  $2\mu$  auch



überschreitet. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheinen diese Grana als zusammengesetzte Einschlußkörper. Ihre Bedeutung bleibt unklar.

9. Die sublichtmikroskopische Struktur der Ganglienzellen wird kurz beschrieben.

### Literatur

- BARGMANN, W.: Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **34**, 610—634 (1949).
- , u. A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an der Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **46**, 242—251 (1957 a).
- , u. A. THIEL: Elektronenmikroskopische Studie an der Neurohypophyse von *Tropidonotus natrix*. Z. Zellforsch. **47**, 114—126 (1957 b).
- BOCHENEK, M. A.: Untersuchungen über das zentrale Nervensystem der Wirbellosen. Bull. int. Acad. Cracovie, Sér. B **45**, 205—220 (1905).
- BROUSSE, P., S. IDELMAN, et D. ZAGURY: Mise en évidence de lipoprotéines à groupements-SH au niveau des grains de sécrétion des cellules neurosécrétrices de la blatte, *Blattella fusca* Br. C. R. Acad. Sci. (Paris) **246**, 3106—3108 (1958).
- GABE, M.: Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde. Bull. Micr. appl., Sér. 2, **3**, 153—162 (1953).
- La neuro-sécrétion chez les Invertébrés. L'année biol., Sér. III **30**, 6—62 (1954).
- Particularités histologiques des cellules neuro-sécrétrices chez quelques Lamellibranches. C. R. Acad. Sci. (Paris) **240**, 1810—1812 (1955).
- GOMORI, G.: Observations with differential stains on human islets of Langerhans. Amer. J. Path. **17**, 395—406 (1941).
- GRZYCKI, S.: Topography and structure of the probable neurosecretory material in the ganglion cells of the snails (*Limnaea stagnalis* L., *Planorbis corneus* L., *Paludina vivipara* L.). C. R. Acad. Cracovie **1/2**, 5 (1951).
- HERLANT-MEEWIS, H., et J. VAN MOL: Phénomènes neurosécrétoires chez *Arion rufus* et *A. subfuscus*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **249**, 321—322 (1959).
- HODGE, M. H., and G. B. CHAPMAN: Some observations on the fine structure of the sinus gland of a land crab, *Gecarcinus lateralis*. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 571—574 (1958).
- KITADA, J.: A light and electron microscope study on the Golgi bodies in neurones of a pelecypod, *Meretrix meretrix lusoria* (Gemelin). Cytologia (Tokyo) **23**, 334—340 (1958).
- KNOWLES, F. G. W.: A highly organized structure within a neurosecretory vesicle. Nature (Lond.) **185**, 709—710 (1960).
- KRAUSE, E.: Untersuchungen über die Neurosekretion im Schlundring von *Helix pomatia* L. Z. Zellforsch. **51**, 748—776 (1960).
- LACY, D., and R. HORNE: A cytological study of the neurones of *Patella vulgata* by light and electron microscopy. Nature (Lond.) **178**, 976—978 (1956).
- LANG, A.: Lehrbuch der vergleichenden Anatomie der wirbellosen Tiere. 1. Lief.: Mollusca. 2. Aufl., Jena 1900.
- LEMICHE, H.: The anatomy and histology of *Cylichna* (Gastropoda Tectibranchia). Spolia zool. Mus. Hauniensis (Kbh.) **16**, 1—278 (1956).
- LEVER, J.: Some remarks on neurosecretory phenomena in *Ferrissia* sp. (Gastropoda Pulmonata). Proc. kon. ned. Akad. Wet., Ser. C **60**, 510—522 (1957).
- LUBET, P.: Cycle neurosécrétoire chez *Chlamys varia* L. et *Mytilus edulis* L. (Mollusques lamellibranches). C. R. Acad. Sci. (Paris) **241**, 119—121 (1955 a).
- Le déterminisme de la ponte chez les Lamellibranches (*Mytilus edulis* L.). Intervention des ganglions nerveux. C. R. Acad. Sci. (Paris) **241**, 254—256 (1955 b).
- Effets de l'ablation des centres nerveux sur l'émission des gamètes chez *Mytilus edulis* L. et *Chlamys varia* L. (Mollusques lamellibranches). Ann. Sci. natur. Zool. (11) **18**, 175—183 (1956).
- MEYER, G. F., u. O. PFLUGFELDER: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Corpora cardiaca von *Carausius morosus* Br. Z. Zellforsch. **48**, 556—564 (1958).
- PALAY, S. L.: An electron microscope study of the neurohypophysis in normal, hydrated and dehydrated rats. Anat. Rec. **121**, 348 (1955).
- The fine structure of the neurohypophysis. In: Progress in Neurobiology, vol. II, edit. by H. WAELSCH. New York 1957.

- RAWITZ, B.: Das zentrale Nervensystem der Acephalen. Jena. Z. Naturwiss. **20**, 384—460 (1887).
- REHM, M.: Morphologische und histochemische Untersuchungen an neurosekretorischen Zellen von Schmetterlingen. Z. Zellforsch. **42**, 19—58 (1955).
- ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, 15. Aufl. München 1948.
- SCHARRER, B.: Über das Hanströmsche Organ X bei Opisthobranchiern. Pubbl. Staz. zool. Napoli **15**, 132—142 (1935).
- Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. Naturwissenschaften **25**, 131—138 (1937).
- SCHARRER, E. u. B.: Neurosekretion. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd. VI/5, S. 953—1066. Berlin: Springer 1954.
- SCHULTZ, R. L.: Electron microscopic observations of the Corpora allata and associated nerves in the moth *Celerio lineata*. J. Ultrastruct. Res. **3**, 320—327 (1960).
- SCHULTZE, H.: Die fibrilläre Struktur der Nervenelemente bei Wirbellosen. Arch. mikr. Anat. **16**, 57—111 (1879).
- SLOPER, J. C.: Histochemical observations on the neurohypophysis in dog and cat, with reference to the relationship between neurosecretory material and posterior lobe hormone. J. Anat. (Lond.) **88**, 576—577 (1954).
- Hypothalamic neurosecretion in the dog and cat, with particular reference to the identification of neurosecretory material with posterior lobe hormone. J. Anat. (Lond.) **89**, 301—316 (1955).
- SPLITTSTÖSZER, P.: Zur Morphologie des Nervensystems von *Anodonta cellensis* Schröt. Z. wiss. Zool. **104**, 388—470 (1913).
- STRUGGER, S.: Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. Naturwissenschaften **43**, 357—358 (1956).
- WILLEY, R. B., and G. B. CHAPMAN: The ultrastructure of certain components of the corpora cardiaca in orthopteroid insects. J. Ultrastruct. Res. **4**, 1—14 (1960).
- WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E.: Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronen-mikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten. Naturwissenschaften **44**, 287—288 (1957).

Dr. WALTER FÄHRMANN,

Hydrobiologische Anstalt der Max Planck-Gesellschaft, Fuldastation, Schlitz/Hessen



Department of Zoology, University College, Trivandrum, India

THE STRUCTURE OF THE CEREBRAL GLANDS AND CONNECTIVE  
BODIES OF *JONESPELTIS SPLENDIDUS* VERHOEFF  
(MYRIAPODA: DIPLOPODA) \*

By

V. K. K. PRABHU

With 12 Figures in the Text

(Received March 20th, 1961)

Introduction

A short note on the cerebral glands and connective bodies in the diplopod *Jonespeltis splendidus* VERHOEFF has already been published (PRABHU 1959). The present paper is a detailed account of the structure of these organs.

Material and Methods

Adult males and females of *Jonespeltis* caught fresh from the field were employed for the present study. Animals collected within a wide range of seasons were used. All the animals employed possessed a thick calcified body wall. No fundamental difference was noticed in the structure of the numerous animals examined.

Animals were dissected in fixatives or in normal saline (0.7% NaCl). In either case the nerve ring, with the cerebral glands and connective bodies intact, was transferred to one of the following fixatives: BOUIN's, ZENKER's, CARNOY's, HEIDENHAIN's susa, susa-picric acid mixture and BOUIN's fluid in which acetic acid was replaced by 0.5% trichloroacetic acid.

Paraffin sections of 3—10  $\mu$  were cut and stained in GOMORI's chrome haematoxylin phloxin, HEIDENHAIN's Azan, Methyl green-pyronin, and HEIDENHAIN's iron haematoxylin, all of which gave good results. GOMORI's aldehyde fuchsin according to the modification of HALMI and DAWSON, MASSON's trichrome stain and MALLORY's triple stain proved to be unsatisfactory.

Observations

The cerebral glands in *Jonespeltis* usually appear as light bluish triangular structures on either side of the brain, with their apices directed towards the brain and their broad bases away from it (Figs. 1 and 2). Each gland measures about 100  $\mu$  in width at the broadest region and 160  $\mu$  in length. Each is connected to the brain by two distinct nerves about 200  $\mu$  in length. These nerves run more or less close together and meet at the proximal end of the cerebral gland. The anterior nerve is slightly thicker (16  $\mu$ ) than the posterior nerve (about 12  $\mu$  in diameter). These nerves take an upward course as they start from the brain and, after passing above the muscles which connect the base of the antenna with the median dorsal suture of the head, turn downwards and meet at the proximal end of the cerebral

---

\* I have great pleasure to thank Dr. K. BHASKARAN NAIR for guidance and encouragement, Dr. K. K. NAYAR for much helpful and highly constructive criticism and for critically going through the manuscript, Mr. V. ANANTHANARAYANAN and Mr. K. I. VARGHESE for facilities afforded in the department and Mr. R. PARAMESWARAN for help in preparing the manuscript. My sincere thanks are also due to Mr. P. SREEDHARAN NAIR for help in photomicrography, Mr. SHAIK SAHEB for assistance in the preparation of the diagram and Mr. N. K. PADMANABHAN for translating GABE's papers. A senior scholarship awarded to me by the Government of India is also gratefully acknowledged.

gland. The cerebral gland itself is dorsoventrally directed; the distal end of the gland sends out a few long digitate processes. Though the cerebral glands show a light bluish colour in reflected light in the living condition and an opaque whitish colour in formalin and Bouin-fixed material by which they can be at once distin-

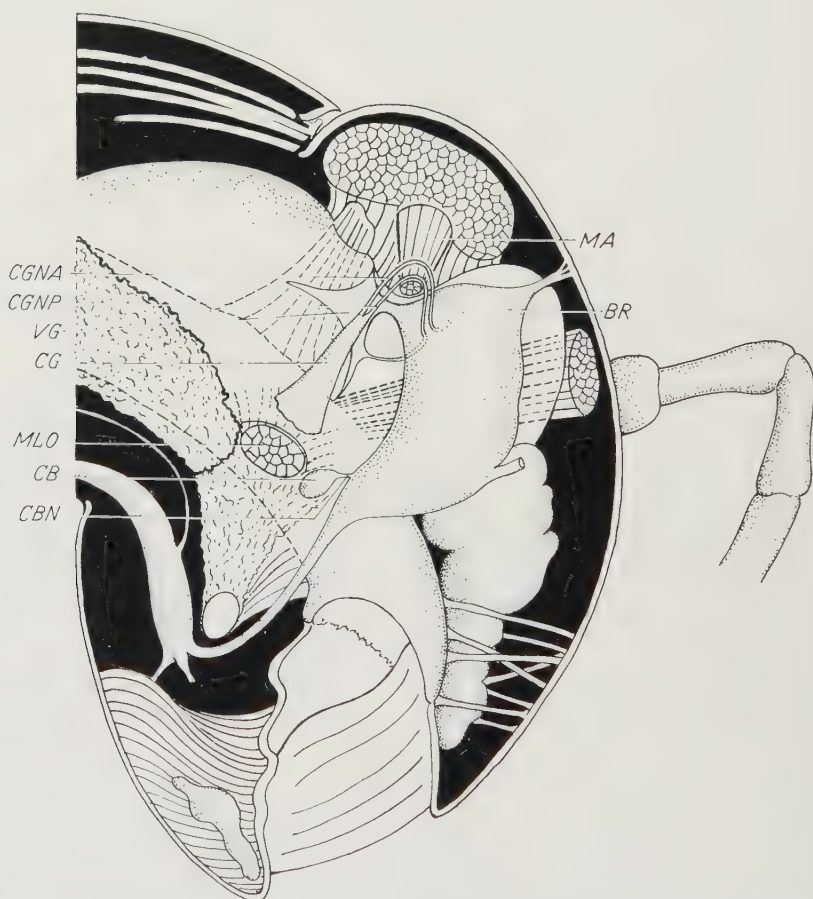


Fig. 1. Diagram showing the position of cerebral gland and connective body of right side and their relationship to the brain and "visceral ganglion". *BR* Brain; *CB* Connective body; *CBN* Nerve of the connective body by which it is attached to the nerve ring; *CG* Cerebral gland; *CGNA* Anterior nerve of cerebral gland; *CGNP* Posterior nerve of cerebral gland; dotted lines in continuation with these nerves indicate their course inside the brain; *MA* Extrinsic muscle of the antenna above which the nerves of the cerebral gland pass; *MLO* Lateral oesophageal muscle; *VG* "Visceral ganglion". approx.  $\times 40$

guished from the surrounding tissues, the nerves have not so far been seen to show this characteristic colour.

Longitudinal sections of the cerebral glands, especially when filled with colloid, show that they are composed of an outer cortex and an inner medulla (Fig. 3). The cortex is usually thick and so densely filled with strongly chromophil colloids that it is difficult to make out its structure. However, these colloids are easily soluble in organic solvents and could be dissolved away if fixed in CARNOY's fluid. In preparations after fixation in CARNOY's fluid, the cortex appears to



be full of large spaces which presumably contained the colloids dissolved by the fixative (Fig. 4). The cortex in fact consists mainly of nerve fibre terminations swollen with dense colloid masses. It is covered externally with a fairly thin homogeneous sheath, the neural lamella, of less than  $0.5\mu$  thickness. This is continuous with the neural lamella of the nerves of the cerebral glands. It is thickest at the proximal end of the cerebral gland, and becomes thin towards the distal end where it gradually disappears. Scattered irregularly in the cortex,

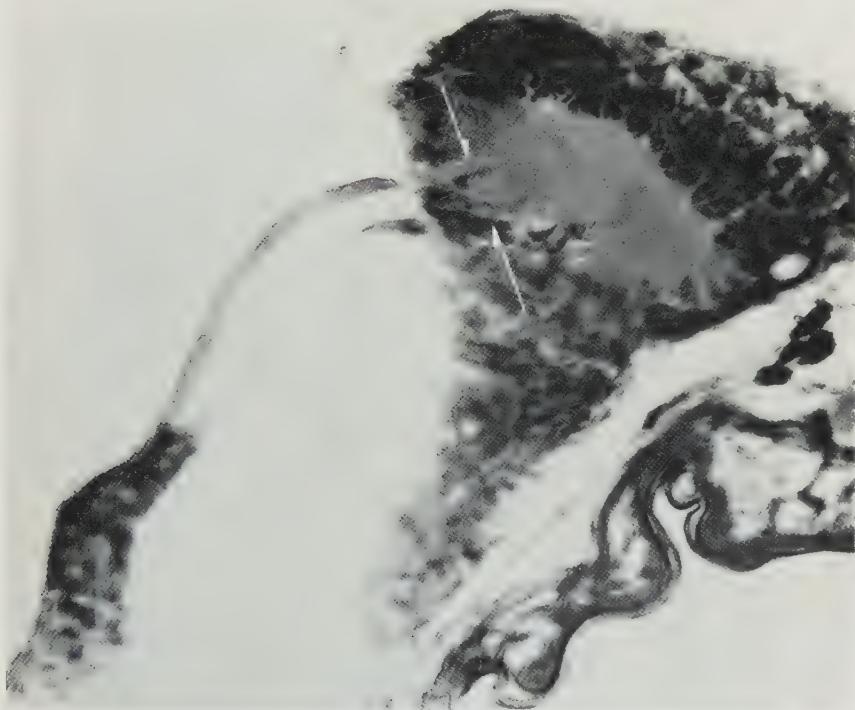


Fig. 2. Cerebral gland (lower left in the figure) attached to the brain by two nerves. The anterior nerve is complete; its course can be followed inside the brain by its lighter shade (indicated by upper arrow). The posterior nerve is incomplete in the figure; its tract can be followed inside the brain by its darker colour (indicated by lower arrow). Bouin, HEIDENHAIN'S iron haematoxylin,  $8\mu$ .  $\times 250$

between the colloid masses, are small nuclei (Fig. 3). These are spherical or oval and are rich in chromatin content. They vary from about  $1.5\mu$  to  $3\mu$  in diameter. The chromatin in these nuclei appears as granules, some of which are strung to the nuclear membrane. Nucleoli could not be made out in these nuclei, which belong to the Schwann cells of the nerve fibres (Schwann cells are regarded in this paper as cells which surround and lie between the nerve fibres as described by HESS (1958) for the peripheral nerve trunk of the cockroach to which the condition here bears a close resemblance). No cell membrane has been noticed in this tissue with the techniques employed. The cytoplasm of Schwann cells is refractory to stains. The digitate processes at the distal end of the cerebral gland are made up mainly of Schwann cells. Enmeshed among the Schwann cells of the cortex are numerous, highly swollen axonal endings of neurons. It has been possible in sections to trace these axons back to their cell bodies. The cell bodies of neurons from which the

anterior nerve of the cerebral gland arises, are grouped into a bunch and placed within the brain. Their axons are closely packed together into a bundle which traverses the neuropile to emerge from the brain as the anterior nerve of the cere-

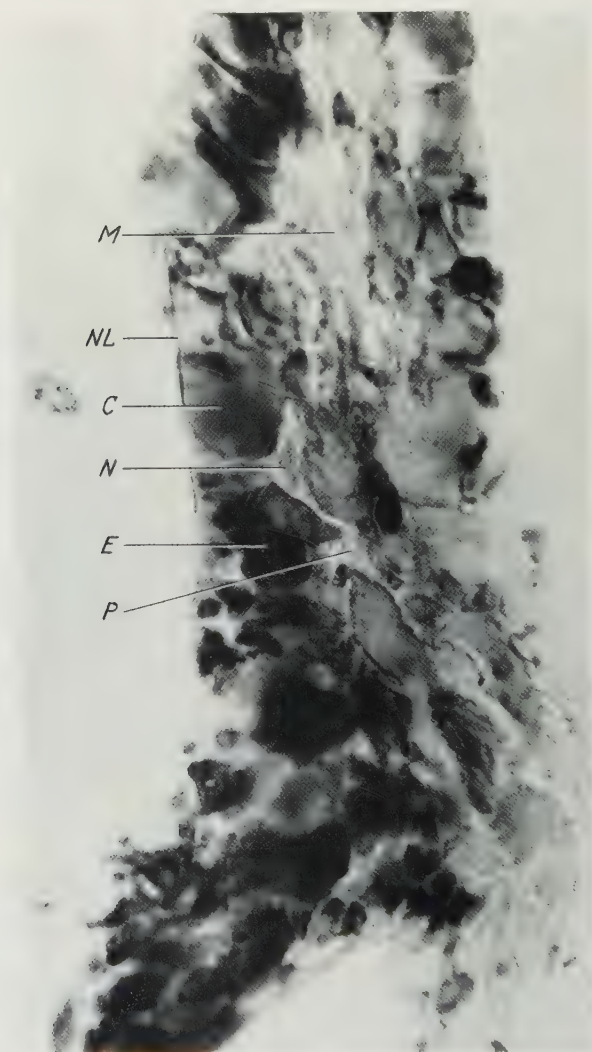


Fig. 3. Section of cerebral gland showing central medulla and peripheral cortex. Distal part of the gland is towards lower side of the figure. *C* cortex; *E* Swollen nerve endings filled with neurosecretory material; *M* Medulla; *N* Nucleus of Schwann cell; *NL* Neural lamella; *P* Schwann cell. Bouin, Azan, 5  $\mu$ ,  $\times 1200$

bral gland (Figs. 1 and 2). The cell bodies of neurons forming the posterior nerve of the cerebral gland are situated in the "visceral ganglion" placed close behind the brain (Fig. 1). Their axons traverse the brain peripherally and emerge from it as the posterior nerve of the cerebral gland. Both these groups of neurons show distinct signs of secretory activity during certain seasons. Besides, granules stainable with the methods mentioned above, have been observed along their



axons. It is beyond any doubt that the cells in question are neurosecretory. Their axons enter the gland in the form of the two nerves mentioned above. The swollen axonal endings in the cerebral glands are intensely stainable; compared to the size

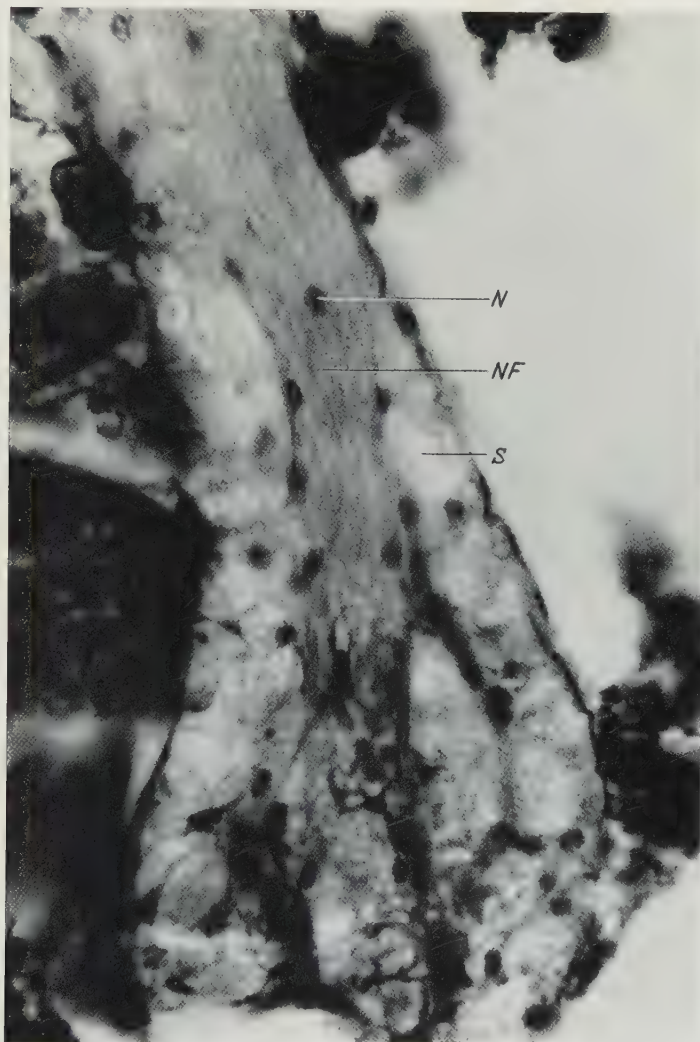


Fig. 4. Longitudinal section of cerebral gland showing cortex and medulla. Distal part of the gland in lower part of figure. *N* Nucleus of Schwann cell; *NF* Nerve fibres in the medulla; *S* Nerve endings in the cortex which originally contained neurosecretory material which was dissolved by CARNOY's fluid. CARNOY's fluid, Azan, 5  $\mu$ .  $\times 1250$

of the nuclei of the Schwann cells, they are huge often attaining a width of 18  $\mu$  (Fig. 3). The chromophil nature of the cortex is due to the intense stainability of these fibre endings. This is due to the presence of neurosecretory material.

The medulla is composed entirely of nerve fibres which reach the cerebral glands in the form of the two nerves from the brain just discussed. Fibres from the anterior as well as posterior nerves mix indistinguishably in the medulla where they

appear to rearrange themselves into branches. These apparently end abruptly at the colloid masses of the cortex, but on close examination it can be seen that the colloid masses are terminations of these nerve fibres swollen with neurosecretory material. The medulla is comparatively chromophobe and stands out clearly from

the chromophil cortex. In the medulla, as in the cortex, there are small chromatic nuclei, belonging to the Schwann cells. It may be noticed that cell bodies of neurons are totally absent in the cerebral glands. The only nuclei occurring in these organs are those of the Schwann cells.

#### *Nature of colloids in the cerebral glands*

The cerebral gland contains basophil as well as acidophil droplets. Both of these types have been found to be osmiophil in KOLATCHEW'S preparations and argentophil in AOYAMA'S. They exhibit affinity for neutral red during vital staining. However, these colloids do not take up neutral red as intensely as Golgi bodies in the neurons of this animal. The methyl green-pyronin method is capable of staining these two types differentially. Pyroninophil colloid is more abundant in the cerebral glands. With HALMI'S paraldehyde fuchsin method, colloids are not stainable with fuchsin, but they take up light green and orange G. However, this is not a good stain as far as cerebral glands are concerned. MASSON'S

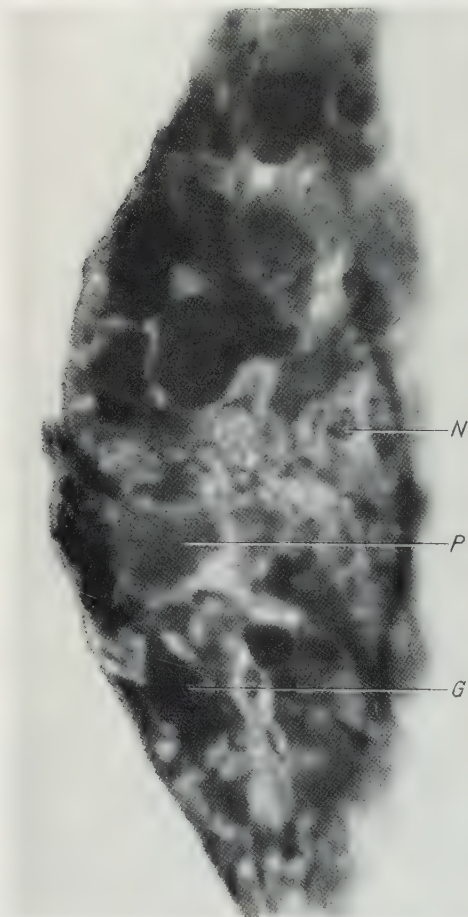


Fig. 5. Section of cerebral gland in summer. *G* Colloid stainable with GOMORI'S chrome haematoxylin; *N* Nucleus; *P* Colloid stainable with phloxin. Bouin, GOMORI'S chrome haematoxylin phloxin, 5  $\mu$ .  $\times 1750$

trichrome method and MALLORY'S triple stain also do not give good results. Unlike these, HEIDENHAIN'S Azan has proved to be an excellent stain for the study of this organ. Irrespective of the season of the year, the glands almost always contain colloids stainable with all three components of Azan. Some of the colloids appear uniformly stained, whereas others show different shades of all three or any two components of the dye mixture. Very often at the distal end of the gland, where it is very thin and possesses digitate processes, the colloid stains diffusely with all three components of Azan. It is here that the cerebral glands are apposed to the wall of a sinus. But proximally the colloids appear as discrete deeply



stainable masses. Probably the diffuse and light stainability at the distal end indicates material of low concentration consisting of several components of secretion mixed together. The discrete, deeply stainable masses at the proximal end may be separate components in concentrated form.

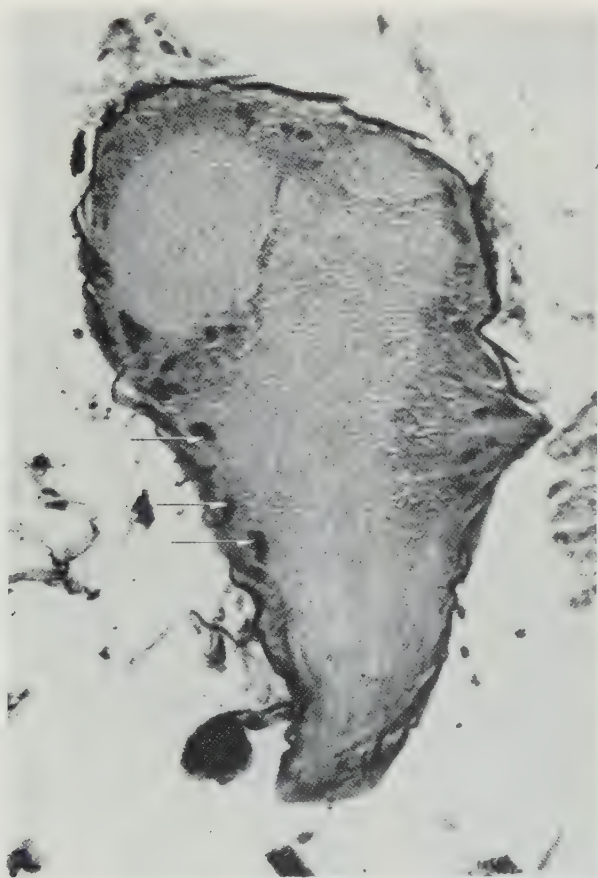


Fig. 6. Parasagittal section of the brain passing through the connective body (lower left in the figure) and its nerve connection with the brain. Arrows indicate the cell bodies of neurosecretory cells whose axons contribute to the formation of "giant fibre" and connective body. Bouin, GOMORI's chrome haematoxylin phloxin. 5  $\mu$ .  $\times 230$

With GOMORI's stain cerebral glands are, for the larger part of the year, stainable with phloxin. A substance stainable with GOMORI's haematoxylin (Fig. 5) is present in them only during the dry, hot summer season of the locality i.e. March to May, when they are found also to take up azocarmine of Azan. During these months, animals are difficult to get, but in three specimens obtained some material stains blue with GOMORI's stain. Prior to this period the glands are comparatively refractory to phloxin and GOMORI's haematoxylin. This, probably, indicates the exhaustion of phloxinophil colloid and the gradual accumulation of colloid stainable blue with GOMORI's stain. A few heavy rains, even during summer, are capable of bringing about a change in the stainability of the colloids in

the cerebral glands. After the rains, colloids in these organs take up phloxin rather than GOMORI's haematoxylin.

Colloids in the cerebral glands take up azocarmine and aniline blue as well as orange G, almost throughout the year. But the quantity of material taking up each of these stains varies appreciably. From January to February most of the

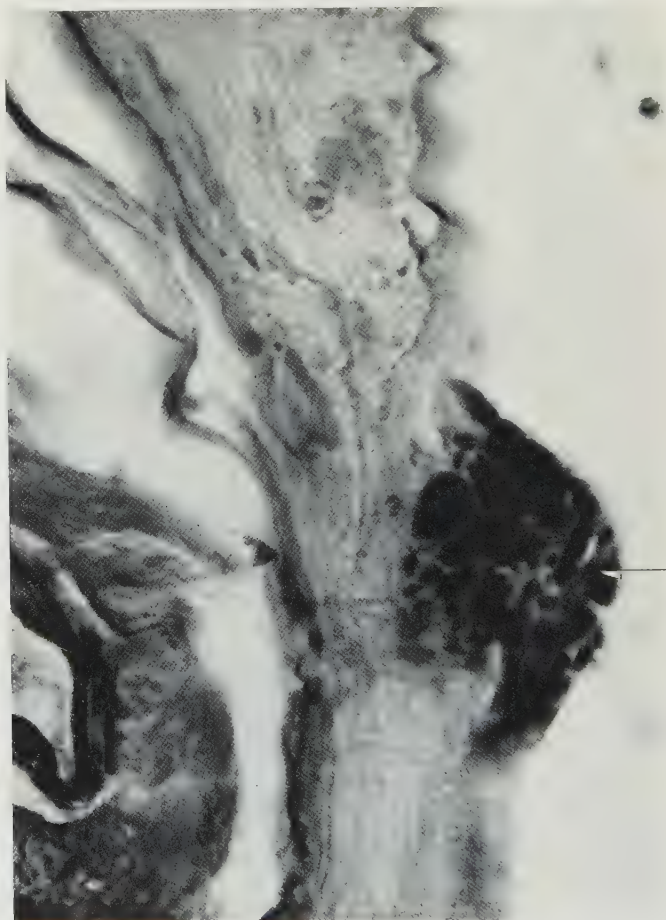


Fig. 7. Section showing the sessile condition of the connective body. Connective body is indicated by arrow. Bouin, GOMORI's chrome haematoxylin phloxin. 5  $\mu$ .  $\times 800$

colloids take up orange G whereas during July and August azocarminophilic colloids predominate in quantity in these organs. Colloids stainable with aniline blue have not been observed to exceed the other two at any time. The same nerve ending may often take up any two or even all three components of Azan, especially at the distal end of the organ. The differential stainability of the colloid described here is not due to differences in fixatives employed.

#### *Connective body*

Connective bodies are usually spherical or oval and attached to the lateral oesophageal connective of the same side, at its beginning, just above the junction



of the postoral commissure with the lateral connective, by a short nerve  $12\mu$  broad (Figs. 1 and 6). This organ also shows a pale bluish colouration in the living condition. Though the stalked condition of the connective body is the rule, exceptions where it is sessile have also been observed occasionally (Fig. 7). In such cases the connective body appears as a swelling below the neural lamella of

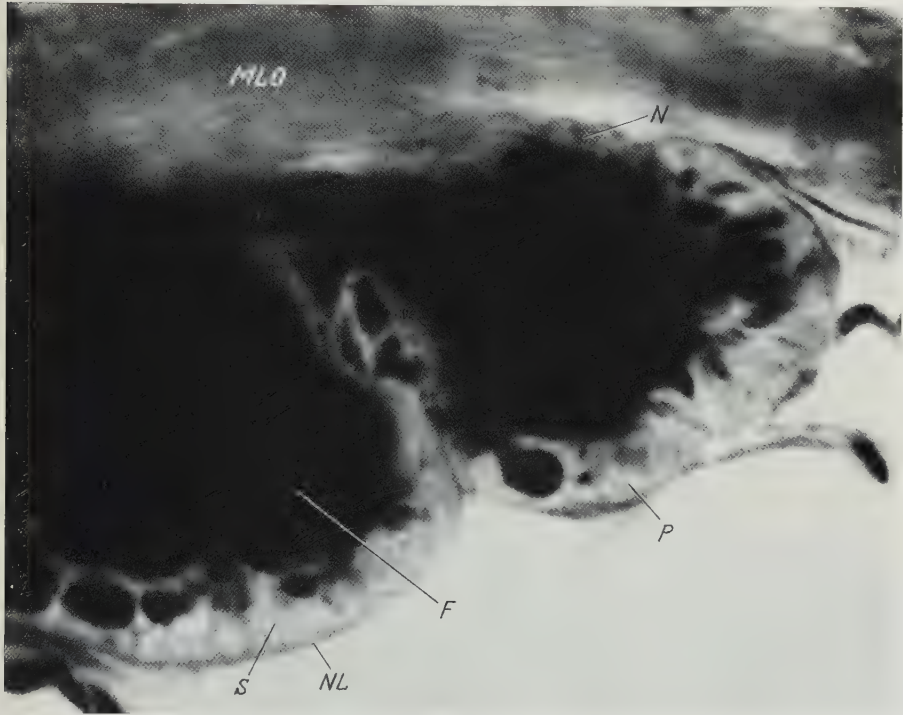


Fig. 8. Section showing bilobed nature of connective body. On the left the proximal, on the right the distal lobe. Nerve endings deeply stainable with chrome haematoxylin. *F* Swollen nerve fibre; *N* Nucleus of Schwann cell; *NL* Neural lamella; *P* Schwann cell; *MLO* Lateral oesophageal muscle; *S* Delicate blue striae radiating from swollen nerve endings; Bouin, GOMORI's chrome haematoxylin phloxin.  $5\mu$ ,  $\times 1200$

the lateral oesophageal connective. Regarding the shape of the body, the spherical or oval form is not always maintained; sometimes it consists of two or three lobes (Fig. 8).

Connective bodies consist essentially of enlarged nerve fibre terminations (Fig. 9). Usually these are highly branched, dangling in a mass of Schwann cells. The nerve endings of the connective body also are so densely stainable with HEIDENHAIN'S Azan and with GOMORI's haematoxylin that their structure is often difficult to make out. In material fixed in CARNOY's fluid they appear as clear spaces as those in the cerebral glands, the whole body having the form of a network of Schwann cells (Fig. 10). The Schwann cells of the connective bodies resemble those of the cerebral glands. The entire connective body is covered by a thin homogeneous neural lamella (Figs. 8 and 11), continuous with the neural lamella of the nerves. As in the cerebral glands this sheath is very thin or even absent, especially at the distal end of the body. Often the nerve fibre terminations are gradually swollen into large bulbar endings,  $2.5$  to  $17\mu$  thick; if highly branched,

as they often are, the terminations are finger-like and not bulbous. The swellings of the axonal terminations are not as abrupt as those of the cerebral glands. Also, the central portion of the connective body is more deeply stainable than the peripheral portion (Fig. 8), unlike the situation in the cerebral glands. The cell



Fig. 9. Section of connective body showing two nerve fibres (indicated by arrows) stainable with chrome haematoxylin gradually swelling into bulbous endings. *N* Nerve joining the connective body with the nerve ring. Bouin, GOMORI's chrome haematoxylin phloxin,  $5\mu \times 1200$

bodies of the fibres are situated on the ventral and mesial side of the brain (Figs. 12a and b). They are very often filled with colloids densely stainable with GOMORI's haematoxylin and azocarmine of HEIDENHAIN'S Azan; they are thus neurosecretory in character. There are 10—15 of these cells along the ventral and mesial side of the brain. Axons from these neurosecretory cells unite to form a fairly thick nerve fibre, charged with secretory granules, which stands out very distinctly from the surroundings in GOMORI's chrome haematoxylin phloxin due to its blue colour (Fig. 12a). The fibre thus formed is irregular showing a slightly wavy course. It represents an unusually broad ( $17\mu$  in places) "giant fibre" when compared to the other fibres of this animal which are less than  $2\mu$  in breadth.



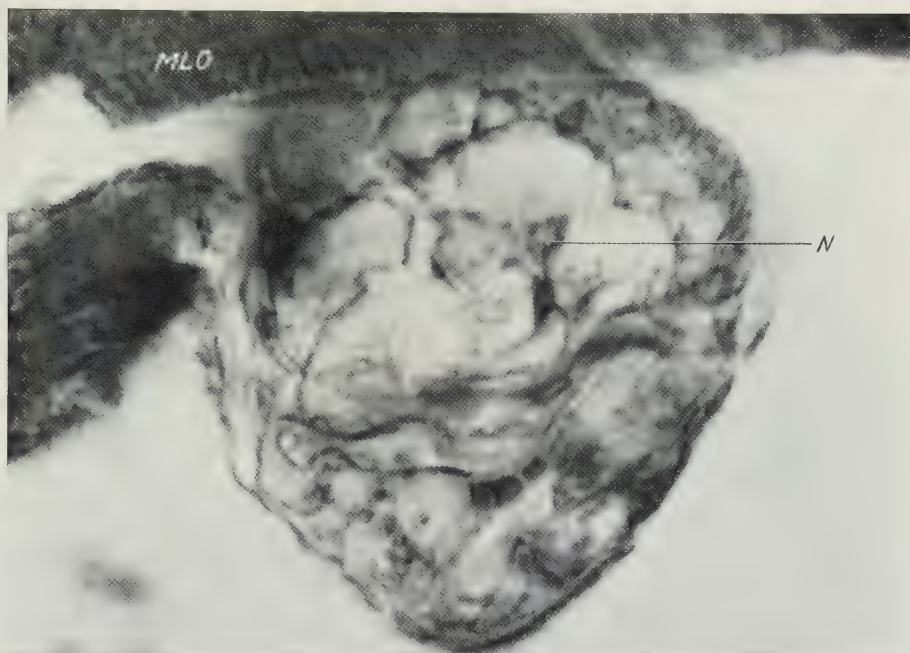


Fig. 10. Section of connective body showing the appearance of a network of Schwann cells. The lighter spaces represent swollen nerve endings which originally contained neurosecretory material dissolved by CARNOY's fluid. MLO Lateral oesophageal muscle; N Nucleus; CARNOY's fluid, C. H. P.  $5\mu$ .  $\times 1900$

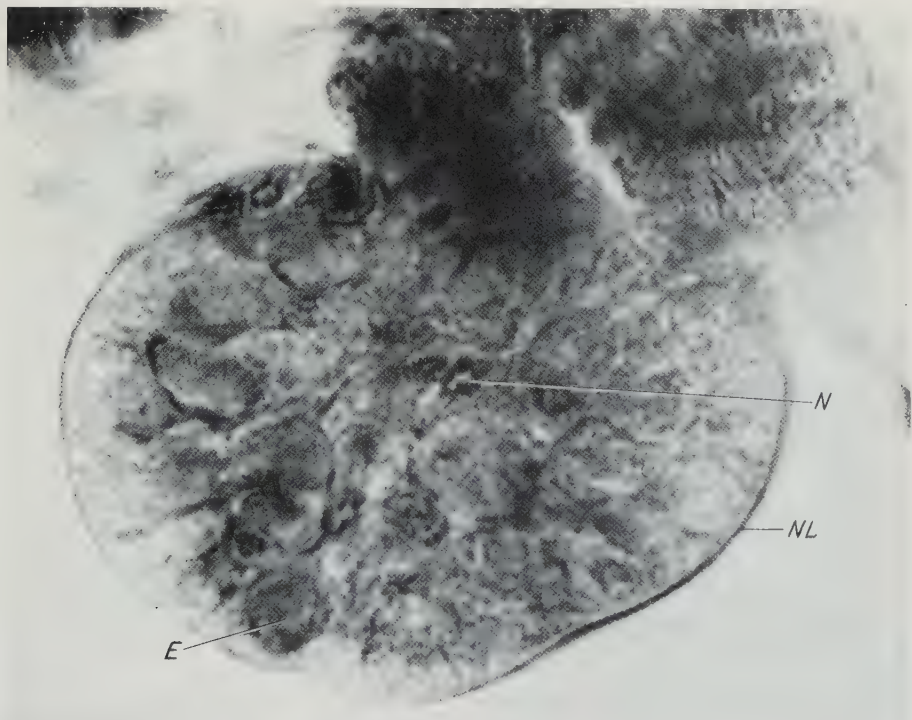
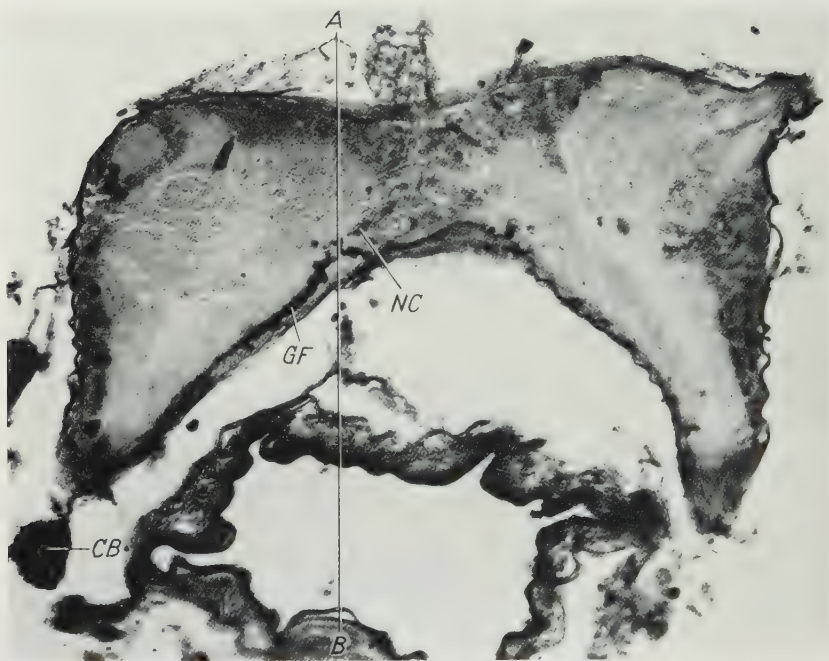
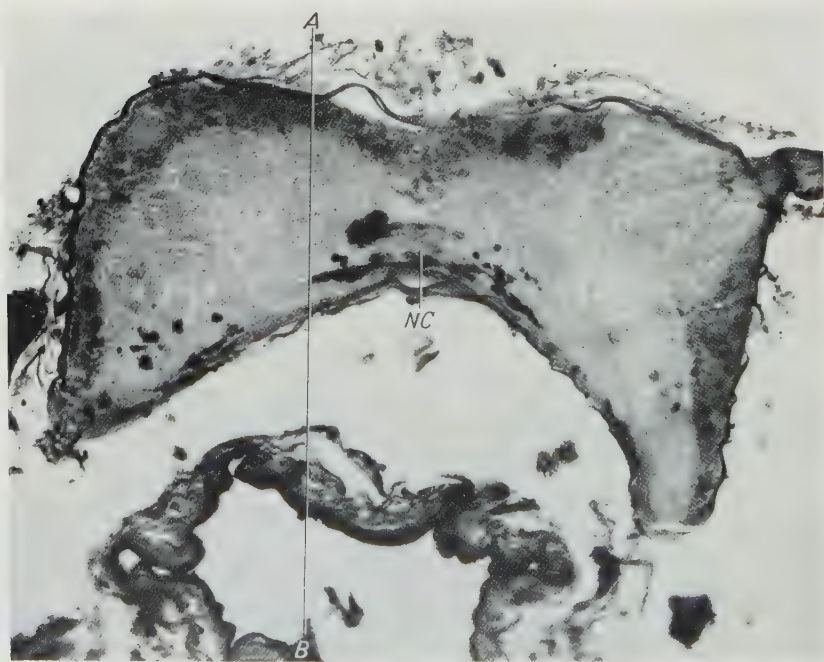


Fig. 11. Section of connective body showing gradual decrease in stainability towards periphery which suggests diffusion of neurosecretory material to the outside. E Swollen nerve endings; N Nucleus of Schwann cell; NL Neural lamella. Bouin, Azan,  $5\mu$ .  $\times 1800$



a



b

Fig. 12 a and b. Photographs of two consecutive transverse sections of the brain showing the origin of "giant fibre" (*GF*) taking its origin from neurosecretory cells (*NC*) and entering the connective body (*CB*). The two figures when superimposed along line *AB* will illustrate this clearly. Bouin, Gomori's chrome haematoxylin phloxin,  $5\mu$ .  $\times 170$



As the composite axon is about to enter the connective body it breaks up into two or three branches which run closely parallel to each other. Once they enter the connective body they swell into large bulbous endings or ramify through it and end in thick fingershaped processes. Even the very small branches are sharply defined from the surrounding Schwann cells in GOMORI's haematoxylin with which they stain deep blue-black, densely and uniformly. With the methyl green-pyronin method likewise these nerve endings as well as the colloid of the tract inside the brain, are sharply defined. All these take up methyl green intensely. The fibre endings are strongly osmiophil in KOLATCHEW's preparations and argentophobe in AOYAMA's method. But in the latter, silver is deposited around the fibre terminations. In Azan the nerve fibres charged with colloid do not give such a high contrast (Fig. 11). These take up all the components in a rather diffuse manner and could not be sharply delineated from the surrounding Schwann cells which take up aniline blue lightly. The central portion of the connective body is, however, more deeply stainable than the periphery and the depth of the stain decreases gradually towards the periphery. Probably this suggests a diffusion of secretory material from the nerve fibres outwards, i.e. into the blood, through the Schwann cells. Even in GOMORI's stain very delicate dark striae could be seen across the Schwann cells, radiating from the nerve endings, under critical illumination (Fig. 8). Besides, certain nerve fibre terminations, which are fingerlike, appear vacuolated at the end. In cross sections these give a deceptive appearance of nuclei containing substances stainable with GOMORI's haematoxylin. Intermediate stages where the nerve fibre endings do not contain so dense colloid masses, but numerous small granules of this substance, could also be noticed. So in all probability neurosecretion is released into the blood by the slow process of diffusion.

It is interesting to compare Figs. 6, 7 and 8. In Fig. 7, the connective body is seen directly attached to the circumoesophageal nerve ring on which it appears as a swelling. The nerve of the connective body, which is usually present, is missing in this case. In Fig. 6 there is a distinct nerve by means of which the connective body attaches to the nerve ring. However, the connective body is single-lobed. Fig. 8 illustrates how an additional lobe is formed, apparently by a branch of the swollen nerve ending, in the originally unilobed connective body pushing out the sheath and subsequently swelling up. In spite of this evidence it is not certain that the connective body is actually formed ontogenetically in this way, as a result of pressure exerted by the nerve fibre endings on the sheath of the nerve ring at the place of its usual occurrence. It may be mentioned here, that the corresponding nerve has invariably been noted in very young individuals also.

### Discussion

Frontal organs of myriapods were described by HOLMGREN (1916) who considered them homologous to the frontal organs of Crustacea, especially to those of *Porcellio scaber*. However, FAHLANDER (1938) was of the opinion that if there is any organ in the myriapod head comparable to the true frontal organ of crustaceans, it is the organ of TÖMÖSVÁRY, which is a peripheral sense organ. According to him, what HOLMGREN described in myriapods as "frontal organ" is not a sensory organ at all, but an incretory organ of the kind of the corpora allata of insects and the x-organ of crustaceans. For this reason he termed it cerebral gland.

Recently GABE (1952, 1954a) and PALM (1956) have described cerebral glands to be concerned with neurosecretion in chilopods and GABE (1954b) and PRABHU (1959) have pointed out the same in diplopods. According to GABE (1954a) the cerebral glands of *Scutigera coleoptrata* are made up of cells rich in acidophil secretion. He has also pointed out that besides this another secretion produced in the neurosecretory cells of the protocerebrum reaches the glands along their axons. PALM has expressed more or less the same view in the chilopods he examined, and GABE (1954b) from a study of eight species of diplopods has come to the same conclusion. According to these authors cerebral glands are comparable to the corpora cardiaca of insects and sinus glands of crustaceans, rather than to the corpora allata and the x-organ. PRABHU, however, was unable to notice any positive proof suggesting migration of secretory material along the nerve fibres to the cerebral gland or any active elaboration of secretion in the cerebral gland itself in *Jonespeltis*, though he observed large phloxinophil masses in these glands. However, later observations have revealed secretory material along both nerves of the cerebral glands suggesting its migration to the cerebral glands. It is of some interest that, unlike previous workers on myriapods, PRABHU noticed an additional nerve of the cerebral gland in *Jonespeltis* seemingly also arising from the brain. However, this second nerve actually takes its origin from a group of neurosecretory cells situated in what corresponds in position to the visceral ganglia described by NEWPORT (1843) in other myriapods.

PALM has given a detailed account of the structure of the cerebral glands of chilopods. According to him, these organs consist of the highly enlarged and intensely stainable fibre terminations of neurosecretory cells situated close to the globuli cells in the protocerebrum. The intense stainability is due to the neurosecretory material present in these nerve fibre endings. According to him, besides these fibre terminations there are cells which show evident secretory activity in the cerebral glands of the chilopods he has examined. He therefore considers these organs homologous to the corpora cardiaca and the x-organ. The cerebral glands and connective bodies in *Jonespeltis* consist essentially of swollen nerve fibre terminations filled with neurosecretory material which is elaborated elsewhere. In this they differ from the cerebral glands of other myriapods. The similarity of cerebral glands of *Jonespeltis* to the corpora cardiaca of insects is interesting. The anterior and posterior nerves of the cerebral gland in *Jonespeltis* are reminiscent of the nervi corporis cardiaci I and II of insects (cf. HANSTRÖM 1940, CAZAL 1948, JOHANSSON 1957). However, whereas one of these nerves of the cerebral glands of *Jonespeltis* arises from a group of neurosecretory cells in the protocerebrum, the other nerve takes its origin from the "visceral ganglion", enters the brain, and emerges from it again, as the posterior nerve of the cerebral gland. In insects, however, both the nervi corporis cardiaci arise from the brain itself. Anatomically also the cerebral glands differ from the corpora cardiaca and allata (CAZAL 1948, NAYAR 1953, JOHANSSON 1957). On the other hand, structurally the cerebral glands and connective bodies of *Jonespeltis* are more closely comparable to the sinus glands of Crustacea originally detected by HANSTRÖM the structure of which has been elucidated by a large number of workers (cf. HANSTRÖM 1947; BLISS, DURAND and WELSH 1954; CARLISLE and KNOWLES 1959, etc.), rather than to the x-organ. It may further be noticed that the cerebral



glands and connective bodies in *Jonespeltis* are also identical in structure with the posterior lobe of the pituitary of vertebrates which consists of fibre terminations of neurosecretory cells situated in the hypothalamus (SCHARRER and SCHARRER 1954b).

KNOWLES (1953) described a pair of connective ganglia in Crustacea more or less in the same position as the connective body of *Jonespeltis*. However, these two organs are not comparable as the connective body is the end organ consisting of nerve fibre endings whereas connective ganglia contain neurons which contribute to the formation of a sinus plate. One may be more justified in comparing the cerebral glands and connective bodies on the one hand and the sinus plate (post-commissural organs) on the other.

Cerebral glands of other millipedes are reported to have cells which contain secretory granules, in addition to the neurosecretory fibre terminations the cell bodies of which are situated in the brain. No such cells have been found in the cerebral gland and connective body of *Jonespeltis*. GEREN and SCHMITT (1954), as quoted by CARLISLE and KNOWLES (1959), have suggested the possibility of Schwann cells surrounding crustacean nerve fibres secreting substances into the axoplasm. However, studies on the cerebral glands of *Jonespeltis* (and also on the connective bodies) made so far, do not indicate any positive proof for the elaboration of secretion in these organs themselves by Schwann cells which are the only cell bodies in these organs in *Jonespeltis*. The cytoplasm of the Schwann cells is not markedly stainable. The nuclei are without any secretory droplets or clear nucleoli; they do not show any polymorphism. There is no vacuolation in the Schwann cells of these organs. Thus it is very unlikely that cerebral glands and connective bodies in *Jonespeltis* themselves produce secretory material. Nevertheless, the possibility of the Schwann cells of these organs secreting a substance cannot be completely excluded. Further work is needed before a definite conclusion can be reached on this point. However, it is beyond any doubt that these organs are not neurosecretory in the strict sense, but merely accumulation centres of neurosecretory material.

The cerebral glands and connective bodies in *Jonespeltis* show a light bluish colour in the living condition. This colour is supposed to be associated with the presence of neurosecretory material (SCHARRER and SCHARRER 1954a). However, JOHANSSON observed that the neurosecretory cells and the corpus cardiacum of live *Oncopeltus* is bluish in colour even though strictly speaking the secretory material is not present in the latter, but only in the wall of the aorta. In *Jonespeltis* it has been possible to demonstrate neurosecretory material associated with the bluish coloration of the organs in question by the staining procedures employed.

Giant nerve fibres have been referred to in annelids (STOUGH 1926, NICOL 1948), insects (ROEDER 1948, COOK 1951), crustaceans (WIERSMA 1947) and certain cephalopods (YOUNG 1936) where they conduct motor impulses resulting in a sudden escape reaction. However, giant fibres of any sort have not been referred to in diplopods (SAINT-REMY 1888, 1890; HOLMGREN 1916). A "giant fibre" staining intensely with GOMORI's haematoxylin has been noticed to arise in the brain of *Jonespeltis* by the union of axons from small neurosecretory cells situated on the ventral and mesial side of the brain. It is interesting to compare this system of neurosecretory cells, their axons and connective body with the epistellar body and

giant nerve fibres of some cephalopods described by YOUNG (1936). He is of the opinion that the epistellar body which is secretory and found close to the stellate ganglion of octopods can be derived from the numerous, small, nonsecretory neurons of the giant fibre lobe situated in a similar position from which the giant fibres of decapods arise as a result of fusion of their axons. He presumes that the cells which give rise to the composite giant fibre in decapods took on secretory activity and as a result lost their giant nerve fibres thereby forming the epistellar body of octopods. In *Jonespeltis* we have an instance where the cells of the "giant fibre" took to secretion, and instead of losing the "giant fibres" retained them and developed a connective body at their tip presumably serving as storage organ.

### Summary

1. Cerebral glands and connective bodies in *Jonespeltis splendidus* VERHOEFF consist essentially of huge swollen fibre terminations of neurosecretory cells, the cell bodies of which are situated elsewhere.

2. The only cells found in these organs are Schwann cells which do not appear to be secretory.

3. Thus, both these organs are neurosecretory storage centres. It is highly unlikely that they produce any secretion of their own. In any case, they are not neurosecretory in the strict sense.

4. They are comparable to each other and also to the sinus glands of crustaceans as well as to the posterior lobe of the hypophysis of vertebrates.

5. They resemble the cerebral glands of other myriapods, corpora cardiaca and corpora allata of insects, and the sinus plate (postcommissural organs) and connective ganglia of crustaceans to varying degrees.

### Literature

- BLISS, D. E., J. B. DURAND and J. H. WELSH: Neurosecretory systems of Decapod Crustacea. Z. Zellforsch. **39**, 520—536 (1954).
- CARLISLE, D. B., and F. G. W. KNOWLES: Endocrine control in Crustaceans. Cambridge: Cambridge University Press 1959.
- CAZAL, P.: Les glandes endocrines rétro-cérébrales des Insectes. Bull. biol. France et Belg. Suppl. **32**, 1—227 (1948).
- COOK, P. M.: Observations on giant fibres of the nervous system of *Locusta migratoria*. Quart. J. micr. Sci. **92**, 297—305 (1951).
- FAHLANDER, K.: Beiträge zur Anatomie und systematischen Einteilung der Chilopoden. Zool. Bidr. Uppsala **17**, 1—148 (1938).
- GABE, M.: Sur l'emplacement et les connexions des cellules neurosécrétrices dans les ganglions cérébroïdes de quelques Chilopodes. C. R. Acad. Sci. (Paris) **235**, 1430—1432 (1952).
- Particularités histologiques de la "glande cérébrale" de *Scutigera coleoptrata*. Bull. Soc. zool. France **78**, 338 (1954a).
- Emplacement et connexions des cellules neurosécrétrices chez quelques Diplopodes. C. R. Acad. Sci. (Paris) **239**, 828—830 (1954b).
- HANSTRÖM, B.: Inkretorische Organe, Sinnesorgane und Nervensystem des Kopfes einiger niederer Insektenordnungen. Kgl. svenska Vet.-Akad. Handl. **18** (8), 1—265 (1940).
- Three principal inkretory organs in the animal kingdom. Copenhagen 1947, 62 S.
- HESS, A.: The fine structure and morphological organization of the peripheral nerve-fibres and trunks of the cockroach (*Periplaneta americana*). Quart. J. micr. Sci. **99**, 333—340 (1958).



- HOLMGREN, N.: Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns von Polychaeten, Onychophoren, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden und Insecten. Kgl. svenska Vet.-Akad. Handl. **56** (1), 1—303 (1916).
- JOHANSSON, A. S.: The nervous system of the milkweed bug *Oncopeltus fuscatus*. Trans. Amer. Ent. Soc. **83**, 119—183 (1957).
- KNOWLES, F. G. W.: Endocrine activity in crustacean nervous system. Proc. roy. Soc. B **141**, 248—267 (1953).
- NAYAR, K. K.: Corpus allatum in *Iphita limbata* STAL. Curr. Sci. **22**, 241—242 (1953).
- NEWPORT, G.: On the structure, relations, and development of the nervous and circulatory systems, and on the existence of a complete circulation of the blood in vessels, in Myriapoda and macrourous Arachnida. First series. Philos. Trans. roy. Soc. London **243—302** (1843).
- NICOL, J. A. C.: The giant nerve-fibres in the central nervous system of *Myxicola*. Quart. J. micr. Sci. **89**, 1—45 (1948).
- PALM, N. B.: Neurosecretory cells and associated structures in *Lithobius forficatus*. Ark. Zool. **9**(4), 115—129 (1956).
- PRABHU, V. K. K.: Note on the cerebral glands and a hitherto unknown connective body in *Jonespeltis splendidus* VERHOEFF (Myriapoda, Diplopoda). Curr. Sci. **28**, 330—331 (1959).
- ROEDER, K. D.: Organization of the ascending giant fiber system in the cockroach (*Periplaneta americana*). J. expl. Zool. **108**, (2), 243—362 (1948).
- SAINT-REMY, G.: Recherches sur le cerveau de l'*dûle*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **106**, 618—620 (1888).
- Contribution à l'étude du cerveau chez les Arthropodes trachéates. Thèses Acad. Sci. Paris, p. 1—276, 1890.
- SCHARRER, E. and B. SCHARRER: Neurosekretion. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 6, S. 953—1066. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954a.
- Hormones produced by neurosecretory cells. Recent Progr. Hormone Res. **10**, 183—232 (1954b).
- STOUGH, H. G.: Giant nerve fibers of the earth-worm. J. comp. Neurol. **40**, 409 (1926).
- WIERSMA, C. A. G.: Giant fiber system of the crayfish. A contribution to the comparative physiology of synapse. J. Neurophysiol. **10**, 23—28 (1947).
- YOUNG, J. Z.: The giant nerve fibers and epistellar body of Cephalopods. Quart. J. micr. Sci. **78**, 367—386 (1936).

V. K. K. PRABHU,

Department of Zoology, University College, Trivandrum (India)

From the Department of Anatomy, University of Minnesota, Minneapolis, U.S.A.

## ELECTRON MICROSCOPY OF NEUROHYPOPHYSIS IN NORMAL, ADRENALINE-TREATED AND PILOCARPINE-TREATED RABBITS\*

By

HISAO FUJITA\*\* and J. FRANCIS HARTMANN

With 21 Figures in the Text

(Received March 25th, 1961)

### A. Introduction

The physiological, pharmacological and histological changes of the hypothalamo-hypophysial system have been the subject of numerous published studies. For instance, it has been shown pharmacologically and physiologically that acetylcholine (PICKFORD 1939), A.T.P. (DEXTER, STONER and GREEN 1954), ferritin (BAEZ, MASUR and SHORR 1952), morphine (DE BODO 1944), nicotine (BURN, TRUELOVE and BRUN 1945), yohimbine (FUGO 1944), pentobarbital and phenobarbital (DE BODO 1945), ether (GINSBURG and HELLER 1953) and histamine (MIRSKY, STEIN and PAULISH 1954) bring about the release of the posterior lobe hormone, and that adrenaline (O'CONNOR and VERNEY 1945) (GIERE and EVERSOLE 1954) inhibits the release of that hormone. Histologically, ARKO, KIVALO and RINNE (1957) found no remarkable change of the gomorphile substance in the neurohypophysis after treatment with each of the first seven substances mentioned above, and SANO, TAMIYA and FUJITA (1956) reported a great increase of the gomorphile substance after injection of adrenaline and a decrease of that substance after injection of pilocarpine.

However, electron microscopic studies of the neurohypophysis in experimental conditions have been published only by PALAY (1957) and by HARTMANN (1958). They found many optically empty secretory granules in the nerve terminals of the neurohypophysis in dehydrated or histamine-treated rats, respectively.

The works cited represent electron optical studies of the neurohypophysis related to a rise in the plasma level of antidiuretic substance and a depletion of neurosecretory materials in the nerve terminals. There are, however, no studies describing fine structural changes of the neurohypophysis after injection of an agent blocking the release of the secretory materials. The first part of the present study, therefore, represents an attempt to observe the fine structure of the neurohypophysis after injection of adrenaline, which is considered as an inhibitor of the release of antidiuretic hormones.

It is also of interest to study the effect on neurosecretion of pilocarpine, which is a parasympathetic stimulator and an antagonist of adrenaline. The second part of the present work is concerned with electron microscopic changes of the neurohypophysis after injection of pilocarpine.

---

\* Supported by a research grant from the Eli Lilly Company, by Grant No. M-388 from the National Institute of Mental Health and by Grant No. B-782 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, U.S. Public Health Service.

\*\* On leave from the Department of Anatomy, Kyoto Prefectural Medical College, Kyoto, Japan.



Although electron microscopic studies of neurosecretion in various animals have been published by GREEN and VAN BREEMEN (1955), DUNCAN (1956), PALAY (1957), FUJITA (1957), BARGMANN and KNOOP (1957), BARGMANN, KNOOP and THIEL (1958), HARTMANN (1958), SANO and KNOOP (1958) and BRETTSCHEIDER (1958), no one has previously examined the rabbit neurohypophysis. Descriptions of the pituicytes in other animal forms are given only briefly by PALAY (1957), BARGMANN and KNOOP (1957), HARTMANN (1958) and BRETTSCHEIDER (1958). It is for this reason that observations on normal ultrastructure in the rabbit, including that of the pituicyte, are presented in some detail here, along with the experimental findings.

## B. Materials and Methods

Adult female rabbits weighing between 3.0—3.5 kg were used in this study. In addition to the use of normal animals, some of the rabbits were injected with adrenaline chloride solution intramuscularly (0.7—1.0 mg/kg body weight) and others with pilocarpine hydrochloride solution intravenously (3.0—5.0 mg/kg body weight). Pentobarbital sodium (50 mg/kg body weight) was injected at autopsy just before decapitation. Adrenaline-injected animals were killed at intervals of 1—2 hours after injection, while the pilocarpine-treated rabbits were killed at intervals of 15—30 minutes after injection. The tissues were fixed in buffered osmium tetroxide for 2 hours at pH 7.2—7.4 (PALADE 1952) and embedded in n-butyl-methacrylate. Sections were cut with the Porter-Blum microtome (PORTER and BLUM 1953) using the glass knife (LATTA and HARTMANN 1950). All sections were examined and photographed in an RCA model EMU-3B electron microscope. Micrographs were taken at original magnifications of 3000—13000 $\times$ , and enlarged photographically as desired.

## C. Observations

### I. Neurohypophysis of Normal Rabbit

**1. Capillaries and Nerve Terminals.** The fine structure of the neurosecretory nerve terminals and pericapillary region of the rabbit in the present study agrees in all essential respects with that described by PALAY (1957) and by HARTMANN (1958) for the rat. The capillary is made up of an endothelium which is surrounded by a two-layered basement membrane, as described by DUNCAN (1956) for *Gallus domesticus*, by PALAY (1957) and HARTMANN (1958) for the rat (Figs. 1, 2). The inner of the two basement membranes is directly subjacent to the capillary endothelium and the outer one is in contact with the nerve terminals or with pituicyte foot processes. Between these two basement membranes there is a pericapillary space. The endothelium shows some pinocytic vesicles and pores here and there (Fig. 2). These pores seem to be bridged by thin membranes considered by PALAY (1957) as being formed by the fusion of the inner and outer plasmalemmae of the endothelial cell. There is an apparent species difference with respect to these pores, for they are absent from the neurohypophysis of the dog and cat (BARGMANN and KNOOP 1957), and the neurohypophysis spinalis caudalis of the perch, *Tinca vulgaris* (SANO and KNOOP 1959). Both layers of the basement membrane are homogeneous at moderate magnification, with a finely granular structure at higher magnification, and show only slight electron density. The pericapillary space between inner and outer basement membranes varies greatly in width from one region to another. It is less than 0.5 $\mu$  in some places and may measure several microns across in other regions. These variations in width of the pericapillary space are considered to be related to the state of secretory function, as

described in a later section. In this almost optically empty space, connective tissue fibrils and fibroblasts are present (Fig. 3). ROMEIS (1940) and SANO (1954) described perivascular argyrophilic networks in the human adenohypophysis and

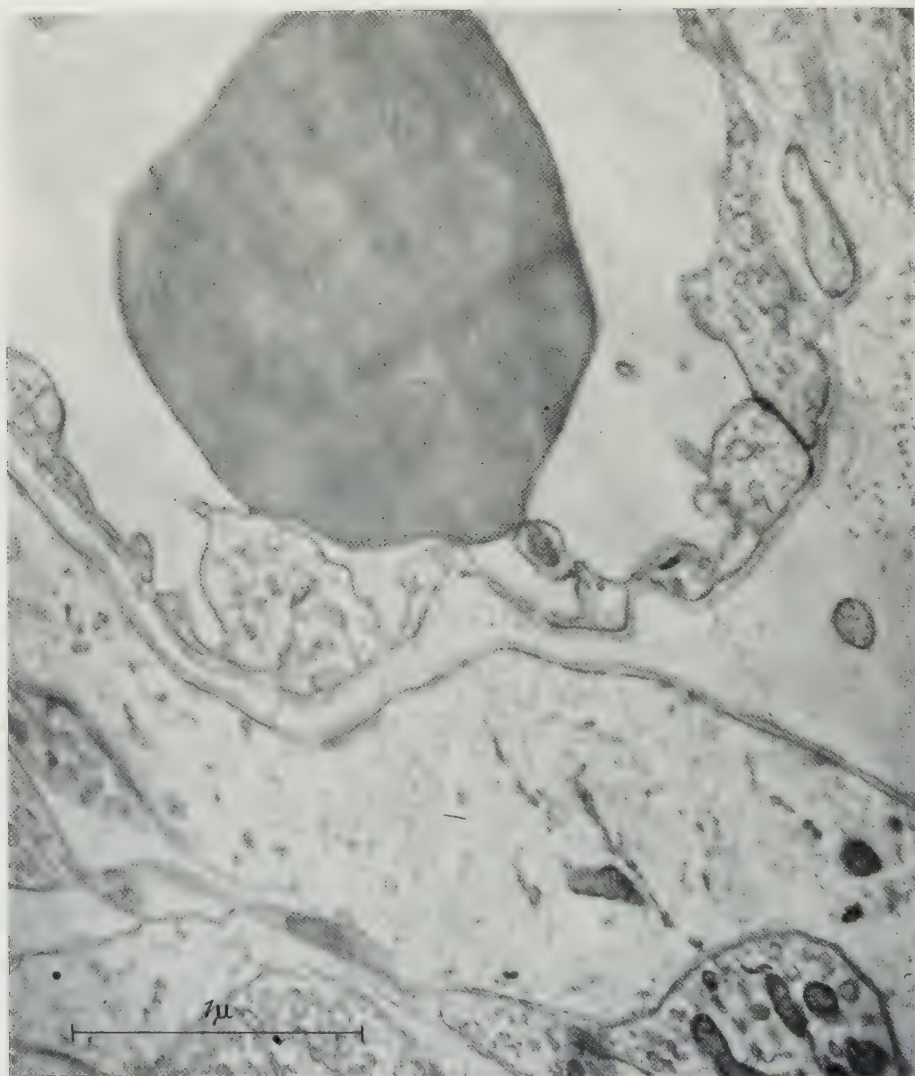


Fig. 1. Capillary in neurohypophysis of normal rabbit, containing an erythrocyte. Outside the endothelium can be seen the inner and outer basement membranes with the pericapillary space between them. A pale pituicyte process (Type A) is in contact with the outer basement membrane across the lower part of the figure. Magnification: 38,285  $\times$

neurohypophysis, and their appearance in mammals has been treated by NAKAGAWA (1957). As HARTMANN (1958) suggests, the fibrous elements here seen in the pericapillary space are considered to correspond to the argyrophilic connective tissue nets described by the light microscope studies referred to above. No neurosecretory granules, however, can be observed in this space.



The fine structure of neurosecretory terminals of normal rabbits is quite similar to that described by PALAY (1957) and by HARTMANN (1958) for the rat, and to the features reported by BARGMANN and KNOOP (1958) for the dog, by BARGMANN,

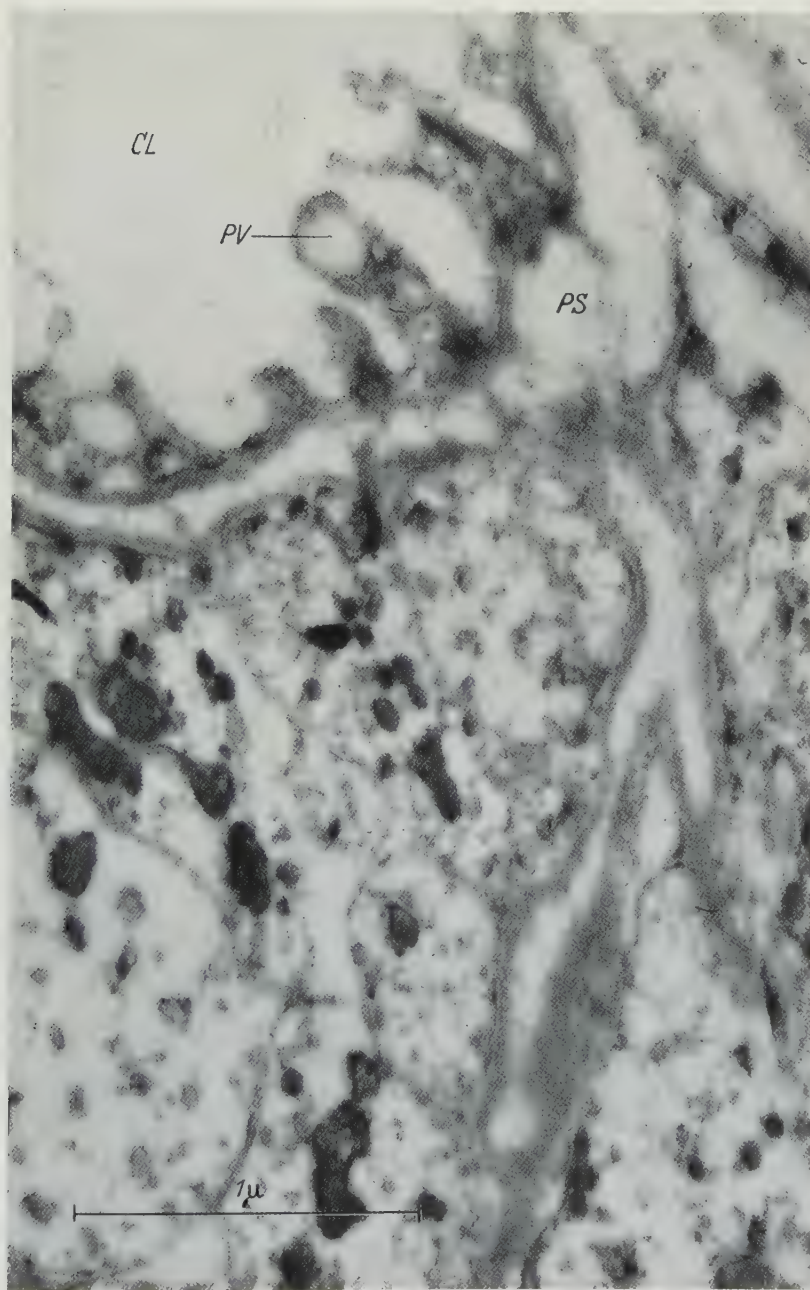


Fig. 2. Part of capillary and pericapillary space in neurohypophysis of normal rabbit. The endothelium contains pinocytotic vesicles. *CL* Capillary lumen, *PS* Pericapillary space, *PV* Pinocytotic vesicle. Magnification: 44,850 ×

KNOOP and THIEL (1957) for reptiles, and by SANO and KNOOP (1959) for fish. The nerve fibers in the neurohypophysis are non-myelinated; each is enclosed by a definite limiting membrane, and contains many neurosecretory granules, synaptic vesicles and mitochondria.

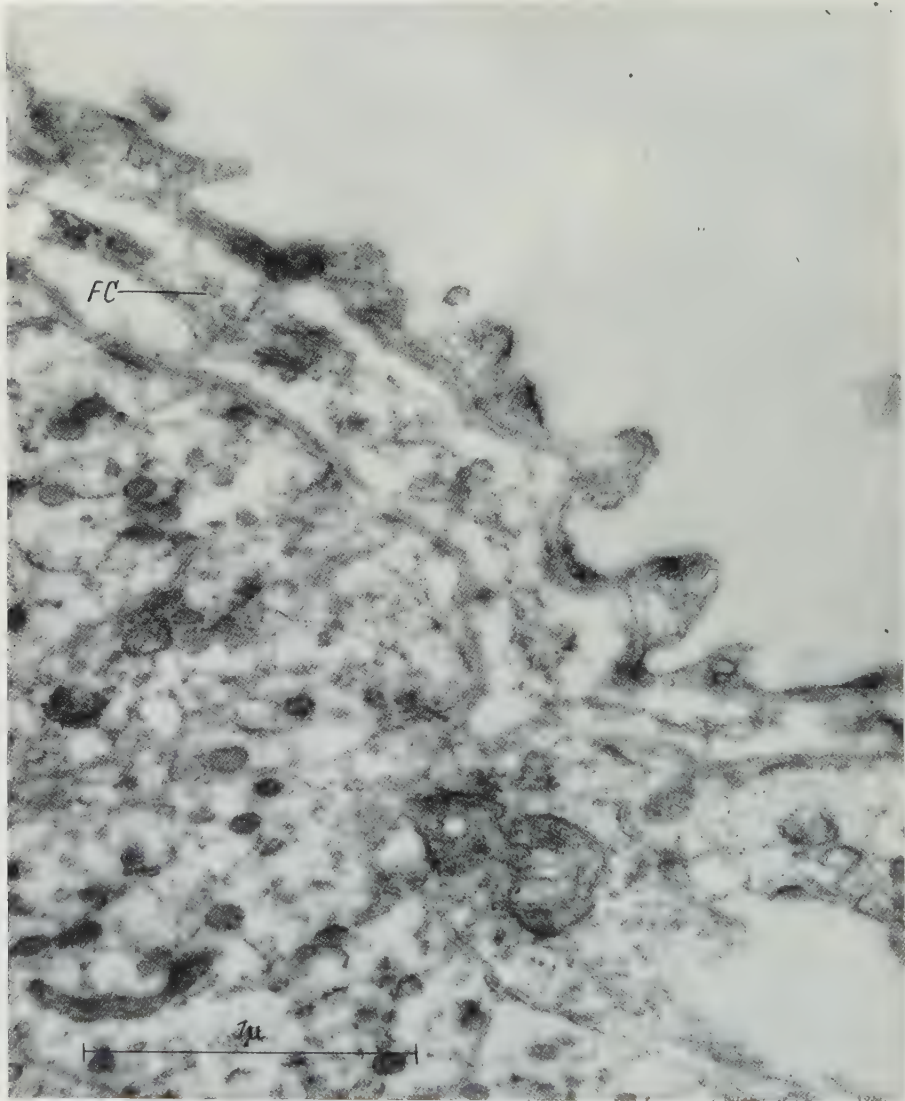


Fig. 3. Neurohypophysis of normal rabbit. Some fibroblast cytoplasm (*FC*) is here seen in the pericapillary space. A ring-shaped mitochondrion is present in the lower part of the figure. Magnification: 44,400  $\times$

The secretory granules of the normal rabbit neurohypophysis average 110  $m\mu$  in diameter. This represents a somewhat lower value than that obtained for the dog by FUJITA (1957), for the cat by GREEN and VAN BREEMEN (1955), and for birds and reptiles by DUNCAN (1956).



In the present work, the size of the granules was found to vary with the functional state of the organ, as will be discussed in the following section. Most mitochondria in the nerve fibers are oval or elongated, but some may be ring-like or horseshoe-shaped (Figs. 3, 4). In the expanded nerve terminals there are many synaptic vesicles (Fig. 4) which can easily be distinguished from neurosecretory granules, as described by PALAY (1957), and HARTMANN (1958) for the rat.

**2. Pituicytes.** The neurohypophysis of the rabbit, when examined with the electron microscope, is unusual in that many kinds of pituicytes are seen, but it

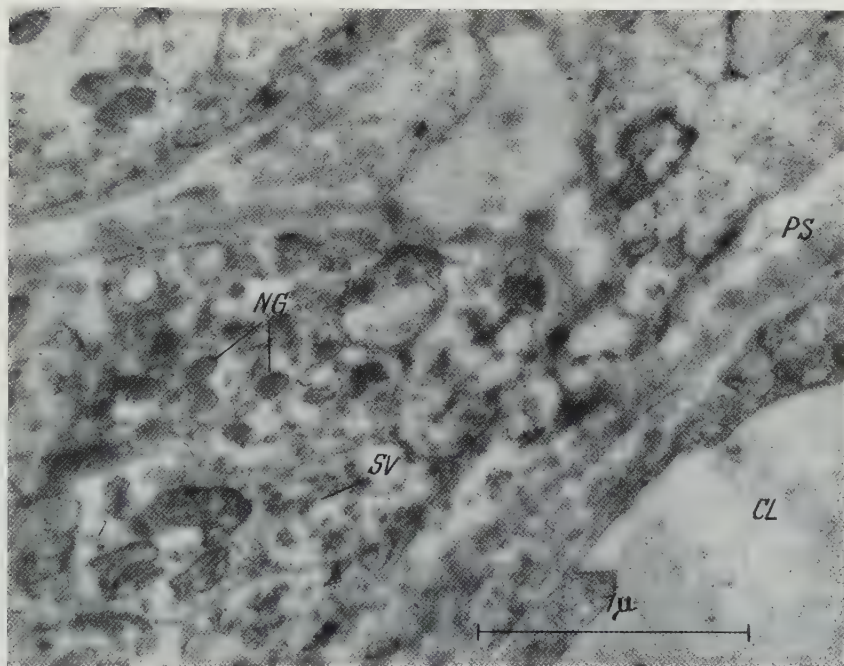


Fig. 4. Neurohypophysis of normal rabbit. A somewhat horseshoe-shaped mitochondrion is present in the nerve terminal at the lower left of the figure. *CL* Capillary lumen, *PS* Pericapillary space, *NG* Neurosecretory granules, *SV* Synaptic vesicles. Magnification: 35,350 ×

seems to be possible to classify all of them into three types, here designated as Types A, B and C. The population of pituicytes shows regional variation in the neurohypophysis (for instance, central as contrasted with peripheral region) and also among individual rabbits. The cell bodies of all pituicytes are usually found in the parenchymatous region far from the perivascular zones.

a) *Type A* (Figs. 1, 5). The pituicyte of this type is similar to the astrocyte in the cerebral cortex described by FARQUHAR and HARTMANN (1957) and by SCHULTZ, MAYNARD and PEASE (1957). Similar cells are scattered in all parts of the posterior lobe except in the perivascular region. However, as a rule, the population of the cells is not as great as that of Type B, and is quite variable from one animal to another. An animal which has many pituicytes of Type A has few of Type B, and conversely. As a rule, the cell body of Type A is as large as that of Type B, but both are larger than cells of Type C. The most striking features of Type A cells are related to the relatively "empty" or "watery"

character of their abundant cytoplasm. A few mitochondria, some endoplasmic reticulum, a few Golgi vesicles and some small particles are seen in a cytoplasmic matrix of very little apparent background density. Most mitochondria are ova-

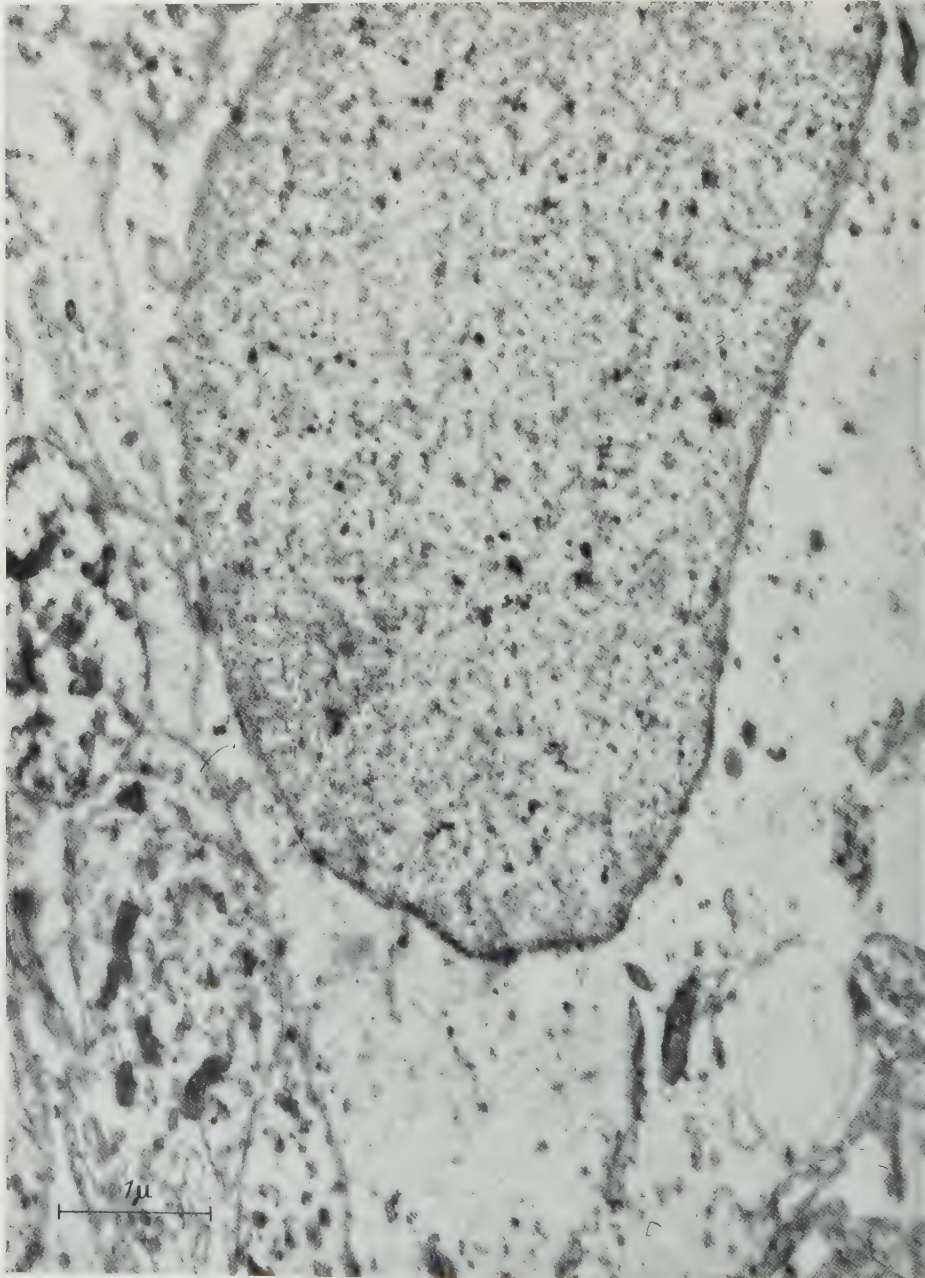


Fig. 5. Part of nucleus and cytoplasm of a Type A pituicyte in the neurohypophysis of a normal rabbit. This pituicyte is similar to the protoplasmic astrocyte, having a "watery" cytoplasm containing few formed elements. Magnification: 19,830  $\times$



with laminar crests, and some of these are long or of irregular form. The nuclei of these cells are mostly ovoid and less dense than the nuclei of Type C. The particles which make up the background density of the nuclei are quite uniformly

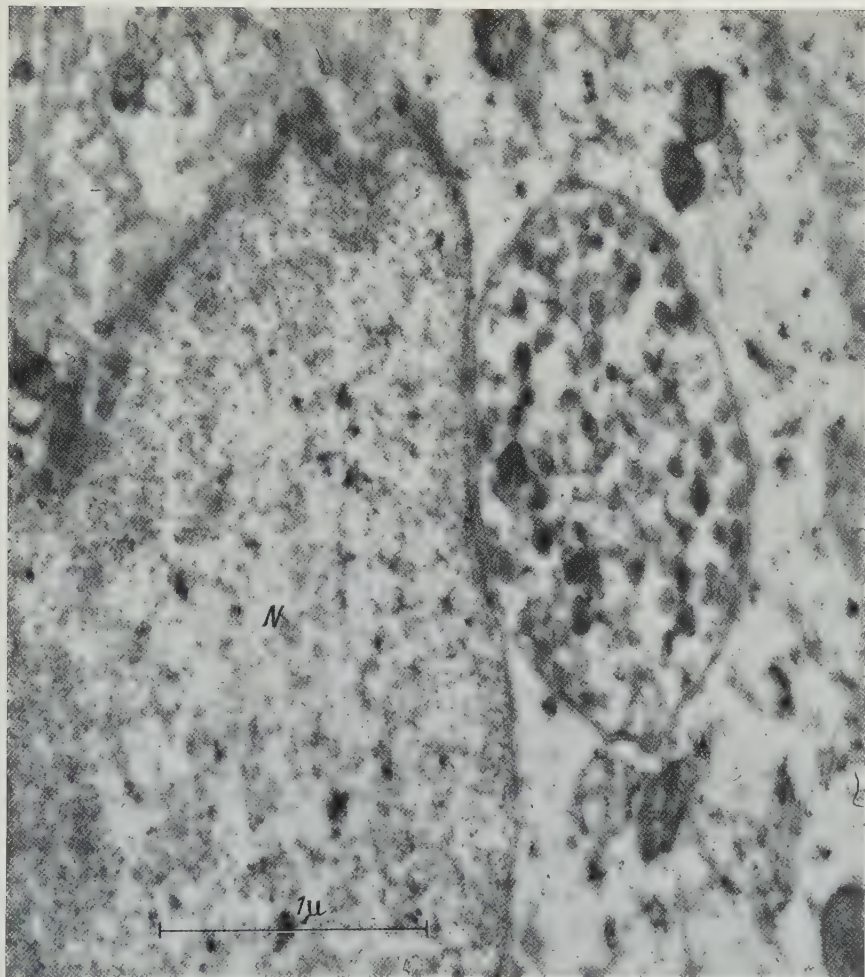


Fig. 6. A nerve fiber or neurosecretory terminal containing neurosecretory granules enclosed within the cytoplasm of a Type A pituicyte. Part of the pituicyte nucleus (*N*) is shown. Magnification: 34,600  $\times$

distributed. Type A cells are in close contact with nerve fibers having many neurosecretory granules, but no such granules can be seen in the cytoplasm of the pituicyte. Sometimes, as PALAY (1957) described, the cytoplasm more or less completely encloses a nerve fiber (Fig. 6). The contact region between the nerve fiber and the Type A cell in the rabbit always consists of a double membrane, with no evidence of a syncytial connection, as was reported for the neurohypophysis of the dog by BARGMANN and KNOOP (1957). Since all cross sections of nerve fibers are oval or round in shape, the pituicyte cytoplasm fitting between these nerve fibers is quite irregular. The pituicyte cell processes extend far from



their cell bodies and sometimes reach to the perivascular region, where they are in contact with the outer basement membrane (Fig. 2). These processes are in contact both with nerve fibers and with other pituicyte processes, and the two are easily distinguished in normal material by the neurosecretory granules in the

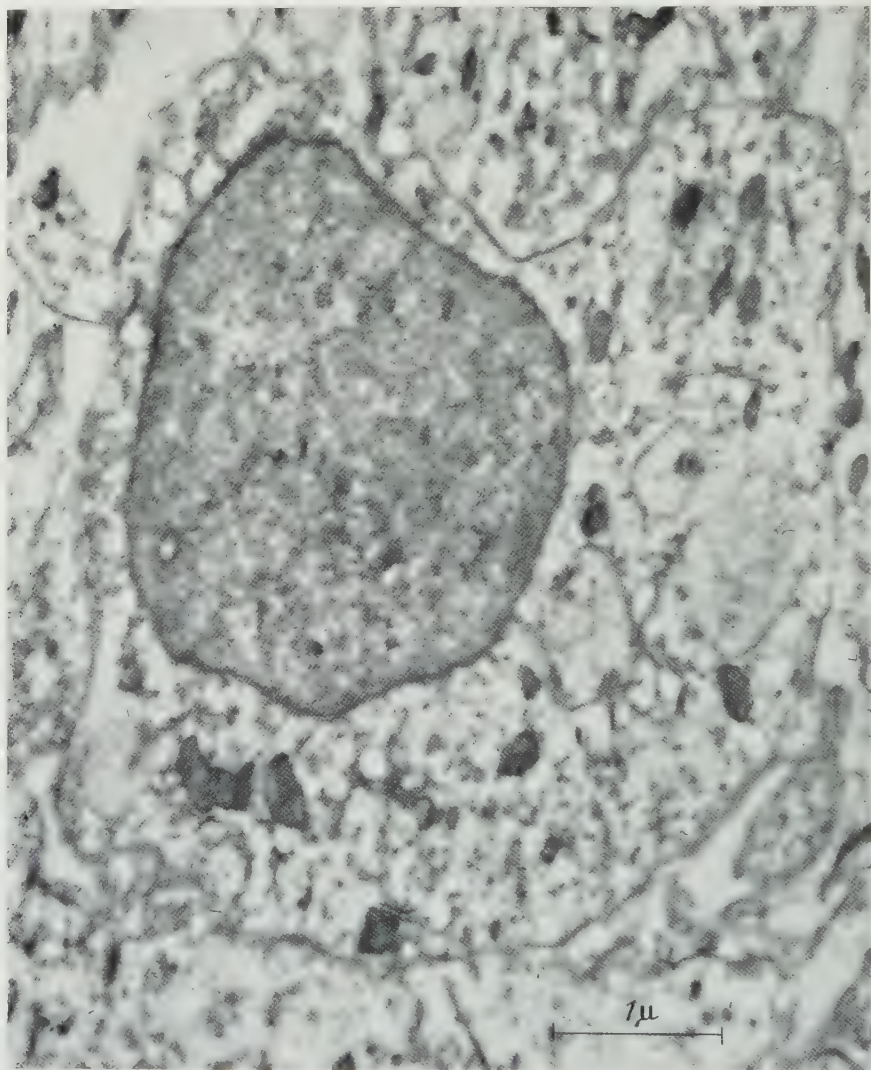


Fig. 7. Type B pituicyte from normal rabbit, having a relatively dense nucleus. The cytoplasm has more background density than Type A, and contains more formed elements. Magnification: 21,200 $\times$ .

nerve fibers. It may, however, be difficult on occasion to distinguish a pituicyte process from a nerve fiber having very few secretory granules.

b) *Type B* (Fig. 7). This cell type is quite numerous in the posterior lobe of the rabbit, except in the perivascular region.

While some nuclei of Type B are very similar to those of Type A, being generally oval or round in shape, others show a greater electron density. The

cytoplasm has many more formed elements than does that of Type A. Mitochondria, mostly very small, and oval or round in shape, are very similar to those in Type A and the endoplasmic reticulum with attached RNP particles is relatively well developed.

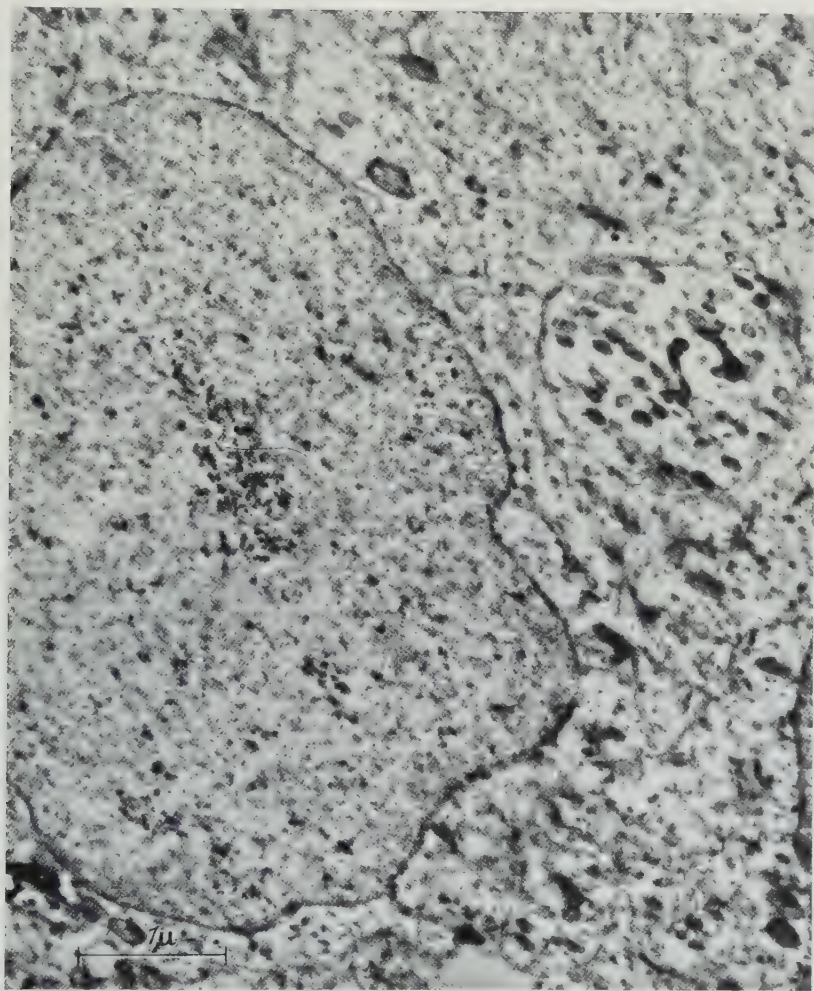


Fig. 8. Type B pituicyte from normal rabbit, with a nerve fiber enclosed in the cytoplasm. Compare with Fig. 6. Magnification:  $18,675\times$

A Golgi apparatus is sometimes seen in the cytoplasm. The large, irregular osmiophilic lipid droplets, which PALAY (1957) and HARTMANN (1958) described in the pituicyte cytoplasm of the rat, are absent from cells of Type A and Type B.

Both Type A and Type B cells have the same topographical relationship to nerve fibers (Fig. 8). Some cells of this type (Fig. 9) could be considered to be the same as Type A, if the many cytoplasmic formed elements are excepted. The cell depicted in Fig. 9 might in fact be considered as an intermediate form between Type A and Type B. The reciprocal relation between numbers of cells belonging



to these two types in a given animal suggests that there may be many transformations between the two types. The Type B cell may be considered as an atypical form of astrocyte. A few cells of Type B are relatively small with round, fairly dense nuclei.

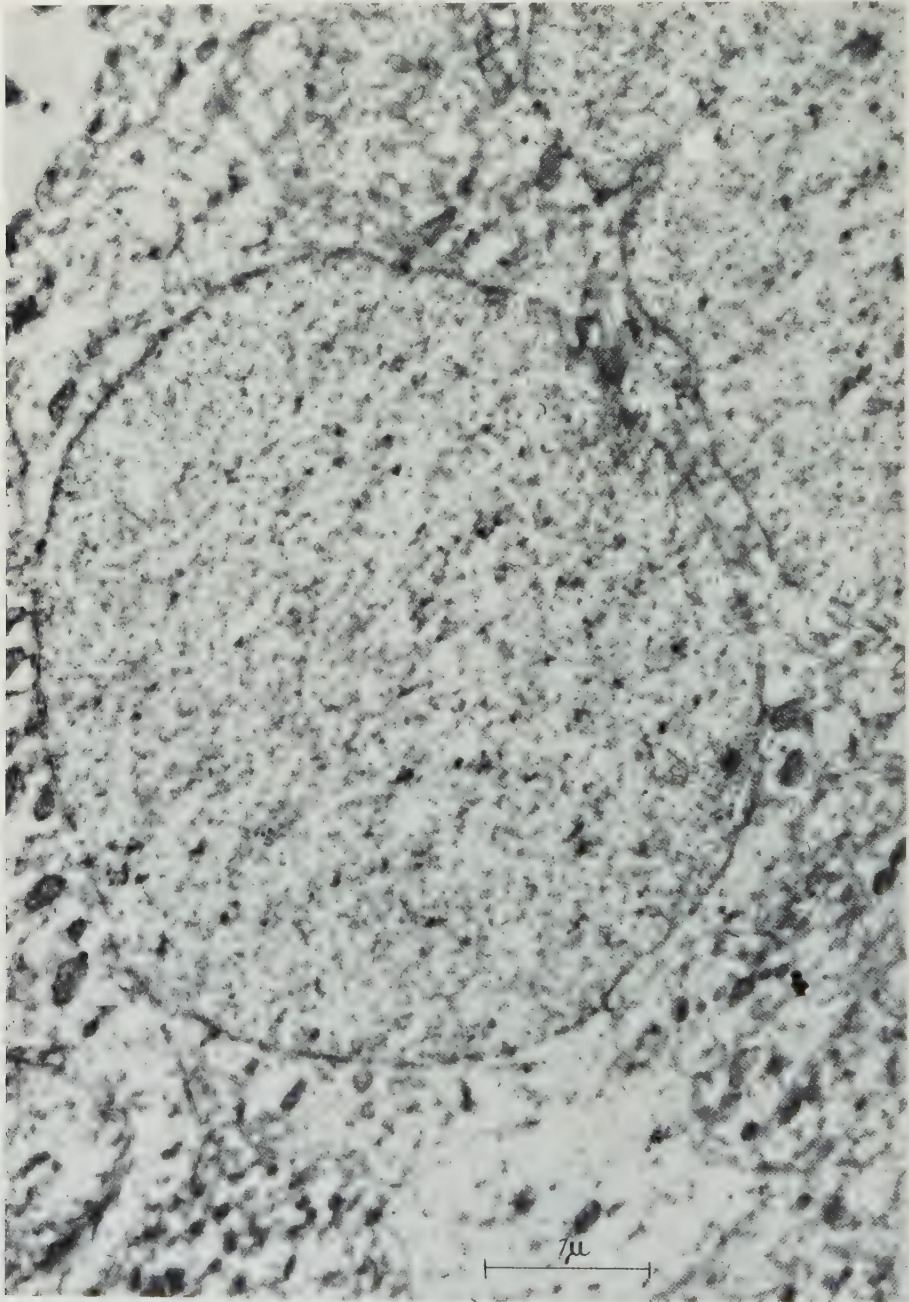


Fig. 9. Pituicyte from normal rabbit considered as belonging to Type B, but with a nucleus resembling that of Type A. Magnification: 21,000  $\times$

c) *Type C* (Figs. 10—12). This type of cell is quite similar to the microglia as described by FARQUHAR and HARTMANN (1957) and by SCHULTZ, MAYNARD and

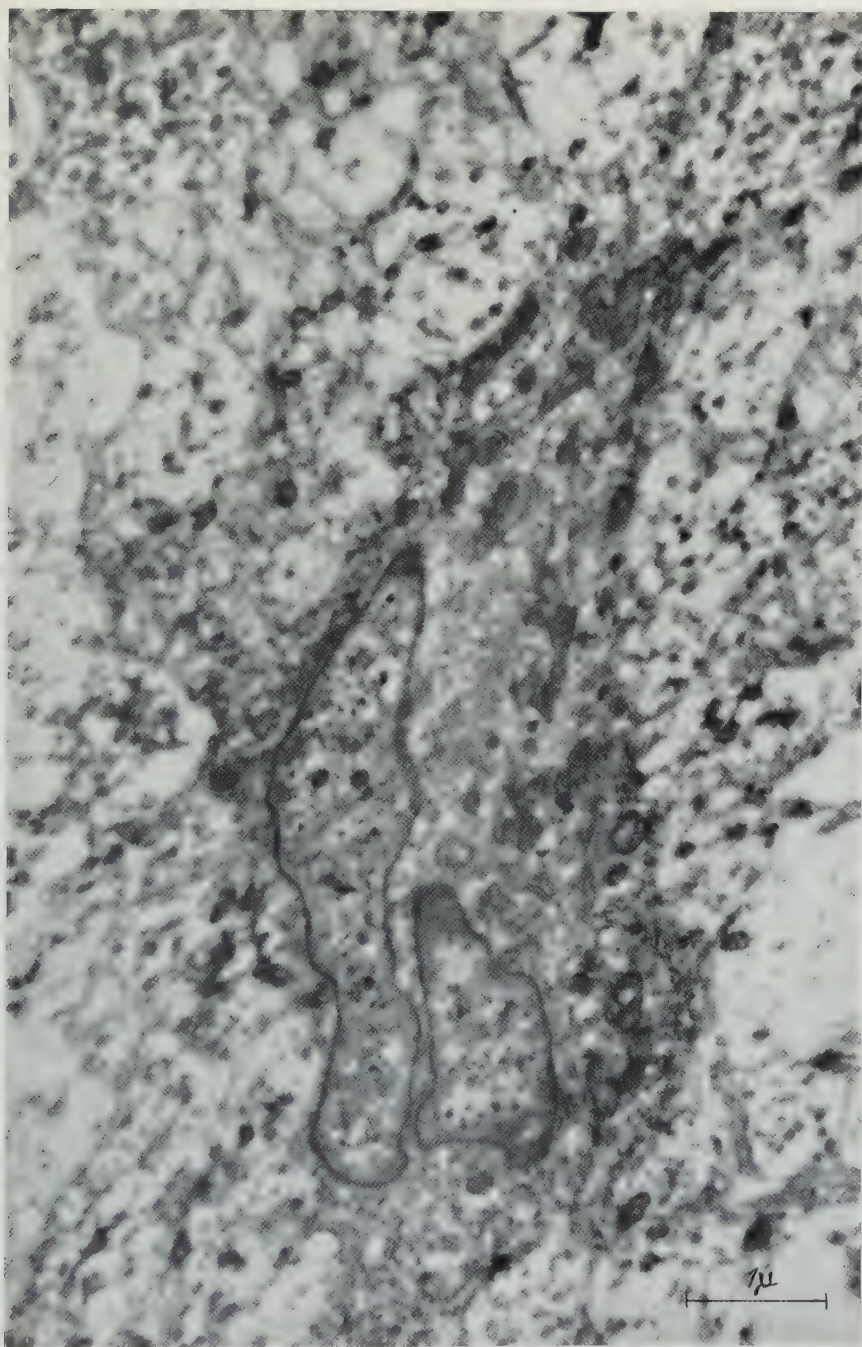


Fig. 10. Type C pituicyte from normal rabbit. This cell is similar to the microglia found elsewhere in the nervous system, with a dense and irregular (possibly lobed) nucleus and dense cytoplasm. Magnification: 17,750 ×



PEASE (1958). Though the cells of Type C are distributed, as are cells of Type A and B, throughout the parenchyma, their number varies greatly in individual animals among controls as well as in both experimental groups.

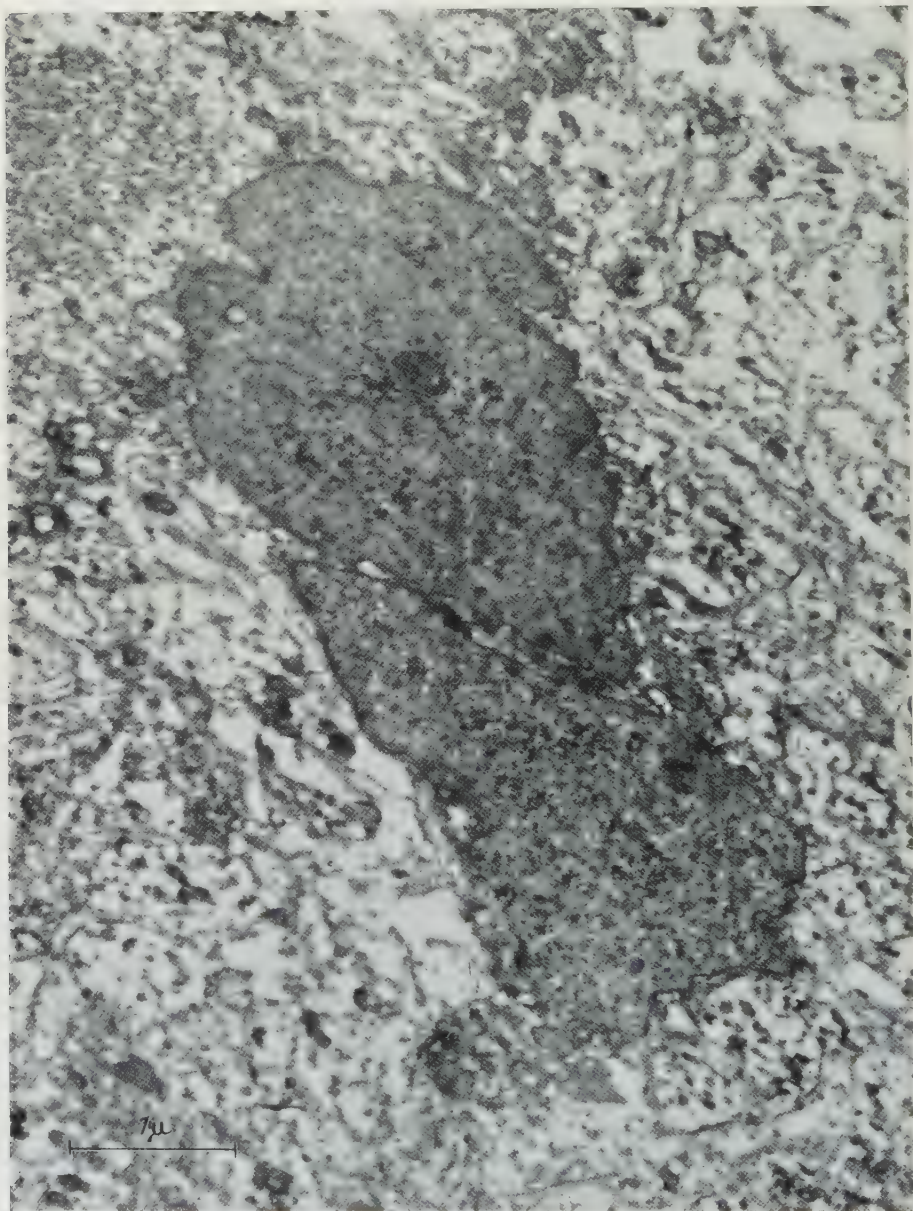


Fig. 11. Two pituicytes of Type C from a normal rabbit, showing the scanty cytoplasm that is nearly as dense as the nucleus. Magnification: 21,500  $\times$

The nuclei are quite irregular in shape and sometimes have large bays or processes, while the nucleoplasm is strongly electron-dense. The scanty cytoplasm is about as dense as the nucleus, so that it is sometimes difficult to distinguish the boundary between the two.

The topographical relationship between this cell type and the nerve fiber is the same as that described above for Types A and B (Fig. 12), but due to their small amount of cytoplasm, Type C cells do not engulf nerve fibers. However, in

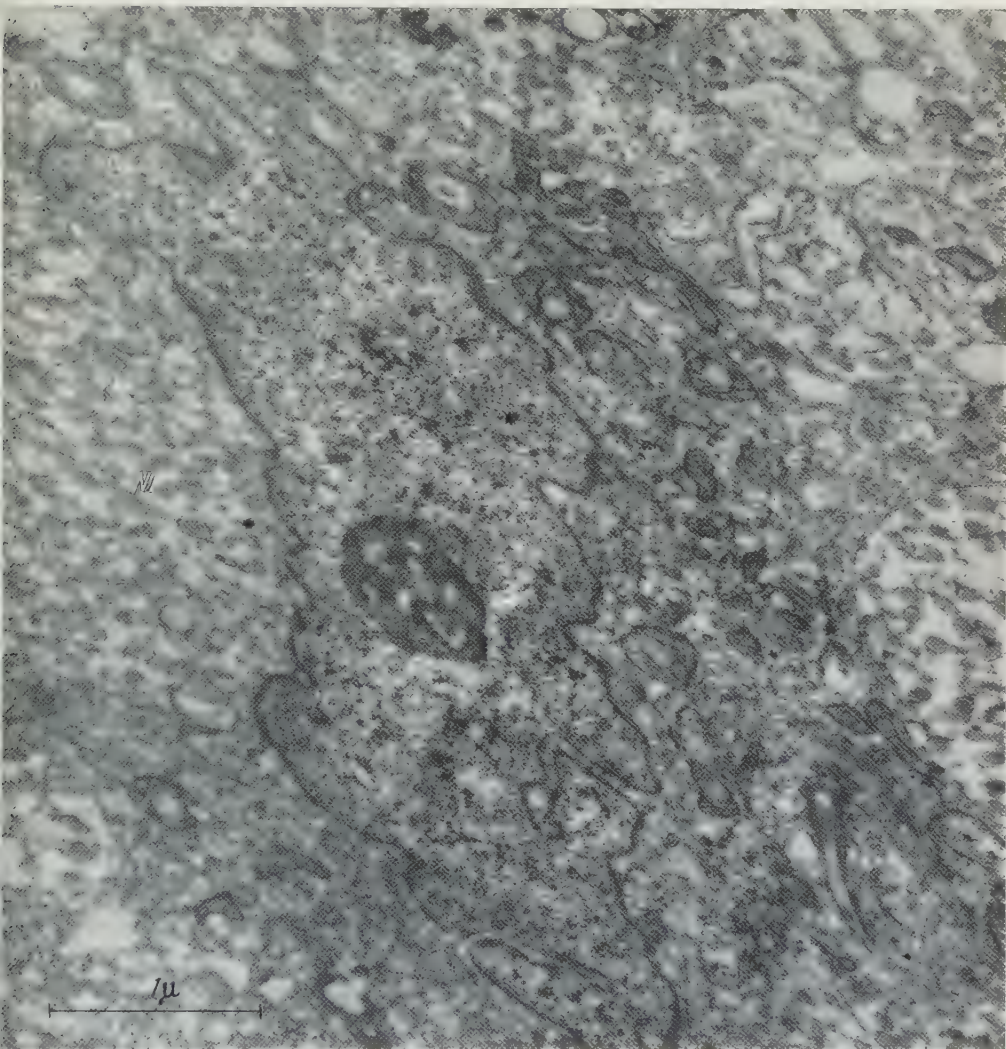


Fig. 12. Type C pituicyte from normal rabbit, showing typical relationship to neural processes (NP) with their contained neurosecretory granules. Magnification:  $27,100\times$

Type C cells, the nucleus frequently lies at one pole of the cell and the amount of overlying cytoplasm is so small that sometimes the nucleus appears to be in contact with the nerve fiber. When this cell is examined in detail, however, some cytoplasm can be made out between the nucleus and the nerve fiber. A great many cell organelles are present in the cytoplasm. The mitochondria are numerous and are oval, elongated, ring-shaped or irregular (Fig. 12). The mitochondrial crests are sometimes laminar and sometimes disordered. The endoplasmic reticulum, other membranous structures and small vesicles are also well developed in the cytoplasm.



In summary, there seem to be three kinds of pituicytes in the neurohypophysis of the rabbit. The first type (Type A) is quite similar to the protoplasmic astrocyte. The second one (Type B) shows a structure suggesting an atypical astrocyte, and the last one (Type C) is similar to a microglial cell.

All classes of pituicytes lie between nerve fibers and are separated from them by double membranes. Sometimes, a nerve fiber is enveloped by pituicyte cyto-

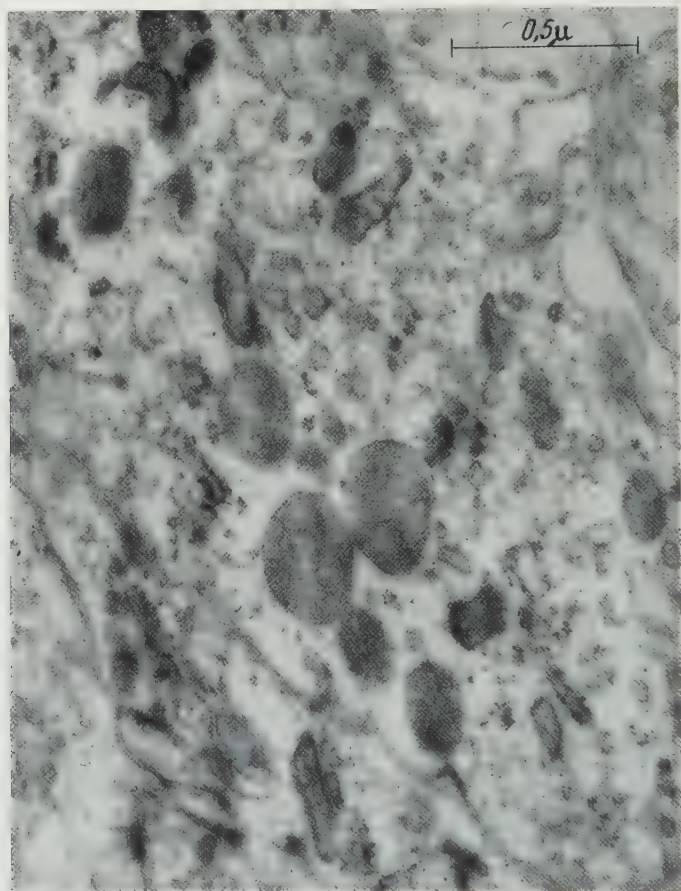


Fig. 13. Large neurosecretory granules in nerve terminal of rabbit neurohypophysis 1 hour after injection of adrenaline. Magnification: 47,250  $\times$

plasm. No pituicyte cell bodies are to be found in the perivascular region, but only their processes, along with those of nerve fibers. These facts suggest that the pituicyte conceivably plays some role, not only for supporting the nerve fibers, but also for regulating the metabolism and possibly the secretory function of the latter.

## *II. Alterations after Injection of Adrenaline*

During the period from 1 to 2 hours after intramuscular injection of adrenaline, a number of changes are observed in the neurohypophysis (Figs. 13—18).

**1. Increase in Number and Size of Secretory Granules in the Nerve Terminals.** By light microscopy, it has been shown that there is a remarkable increase of

gomoriphile substances after injection of adrenaline (SANO, TAMIYA and FUJITA 1956). In relating this finding to electron microscope studies, one must take

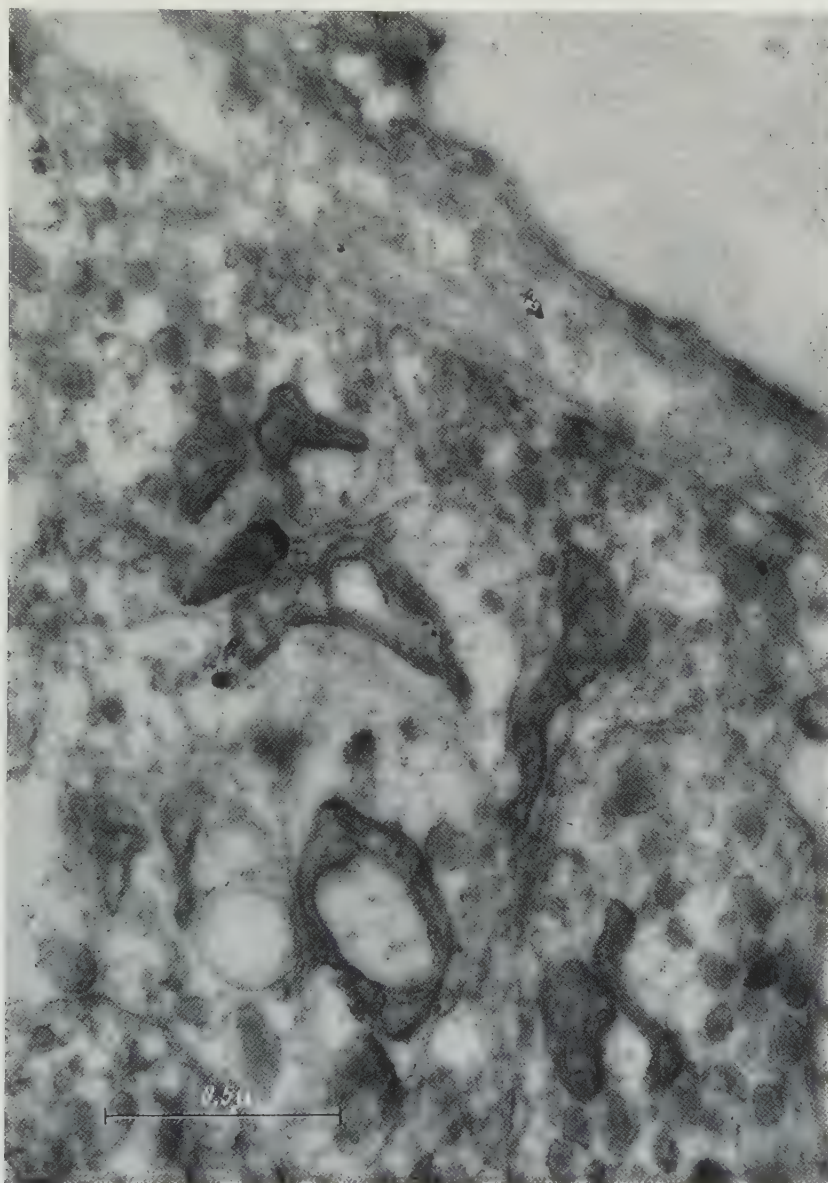


Fig. 14. Mitochondrial alterations (irregular and ring-shaped forms) present in nerve terminals of rabbit neurohypophysis 1 hour after injection of adrenaline. Magnification: 59,500  $\times$

account of regional variations in the population of secretory granules in the neurohypophysis, e.g., they are generally present in greatest numbers in the pericapillary regions or in the peripheral part of the gland. The present observations are limited to the population of secretory granules in the pericapillary nerve terminals. Table 1 gives the results of 40 random counts made on each of the



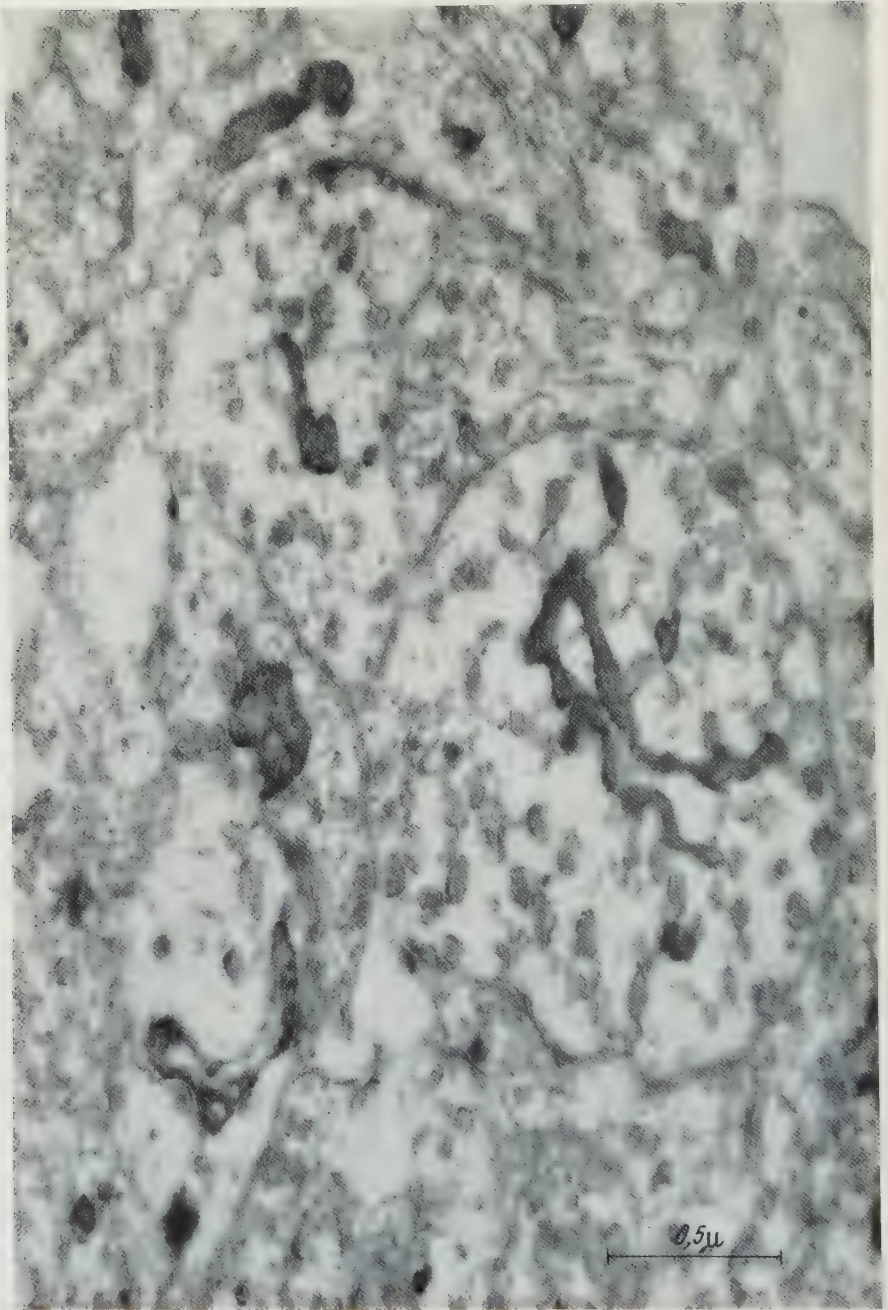


Fig. 15. Alteration of mitochondrial structure in nerve terminals, 2 hours after injection of adrenaline. Elongated and irregular-shaped mitochondria are seen. Magnification: 45,400  $\times$

3 groups of animals, using a number of micrographs from each group. A highly significant increase in both number and size of neurosecretory granules was found after injection of adrenaline. Occasionally, granules measuring as much as 300 m $\mu$

in diameter were encountered in the adrenaline-treated rabbits (Fig. 13), in contrast to a top value of  $200\text{ m}\mu$  for normal animals.

**2. Alteration of Mitochondria.** In normal rabbits, most mitochondria in the nerve terminals are oval or club-shaped with laminar internal structures, but after injection of adrenaline, some of them become long and slender, ring-formed

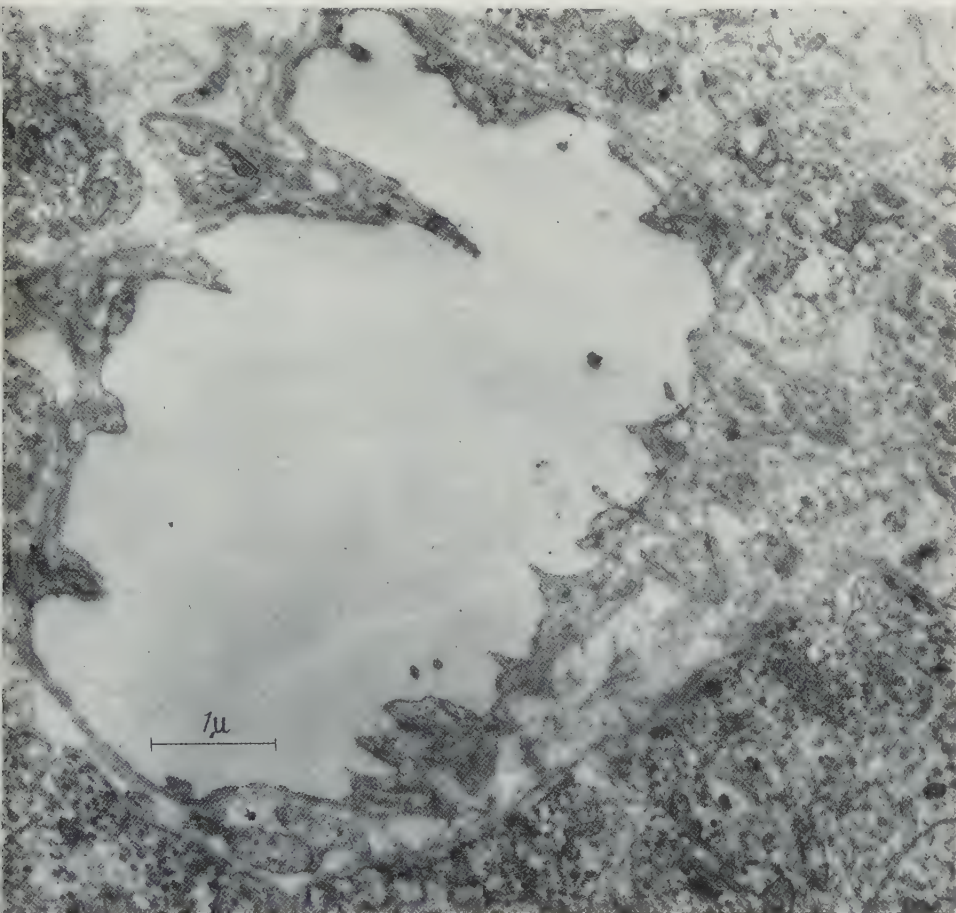


Fig. 16. Enlarged pericapillary space with abundant connective tissue fibrils in rabbit neurohypophysis 1 hour after injection of adrenaline. Endothelial projections are prominent. Magnification:  $16,250\times$

or irregular in shape (Figs. 14, 15). Often, very long, slender and sinuous mitochondria (about  $2\mu$  by  $0.2\mu$ ) appear (Fig. 15). Their crests, however, are normal in appearance.

**3. Alteration of Pericapillary Space.** In normal rabbits, the pericapillary space shows variable width in various parts of the gland. Some narrow parts are under  $0.5\mu$  in width while other parts measure  $2-3\mu$ . Though such variations in width of the pericapillary space are also present in adrenaline-treated rabbits, the space seems relatively enlarged (Fig. 16). However, the inner and outer basement membranes show no remarkable change in structure or in thickness.



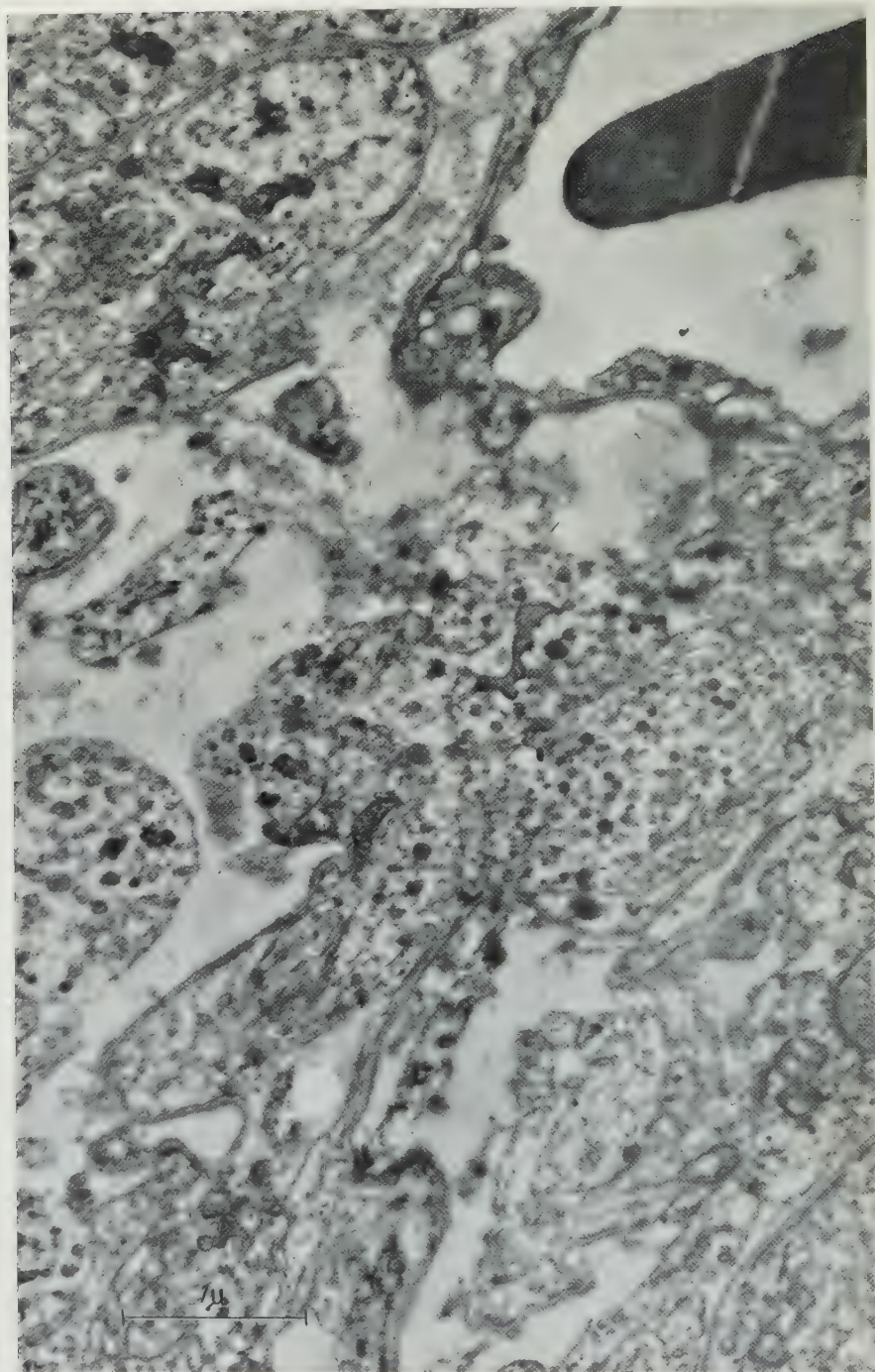


Fig. 17. Nerve terminals appearing to lie free in the pericapillary space (lower left of figure) 1 hour after injection of adrenaline. Magnification:  $23,600\times$

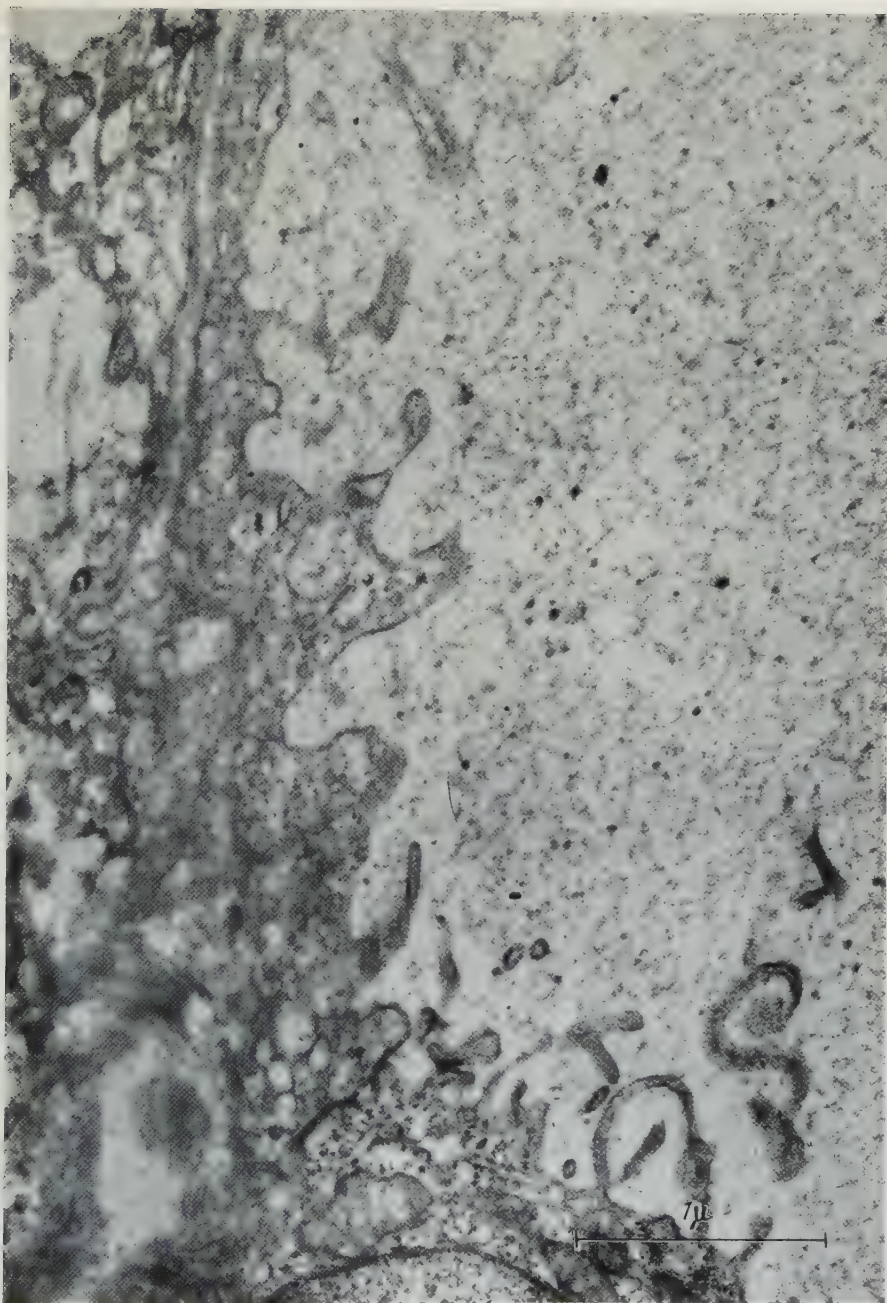


Fig. 18. Villus-like endothelial projections in neurohypophysis of rabbit 1 hour after injection of adrenaline. Magnification: 31,600  $\times$

Some nerve terminals having many secretory granules appear isolated as islands in thin sections through the pericapillary space in these animals (Fig. 17). Since



no basement membrane surrounds such islands, they seem to be nerve fibers penetrating into the pericapillary space. This phenomenon is considered to be produced by an enlargement of the space following injection of adrenaline. FUJITA, KANO, KUNISHIMA and KIDO (1959) reported an attenuation of the pericapillary space in the adrenal medulla of the chick after injection of insulin. It may be presumed that the changes in width of the pericapillary space are related to the functional state of the secretory organs. HARTMANN (1958) suggested that the pericapillary space may represent a metabolic lake which is possibly of physiological significance for metabolic and secretory exchange.

**4. Alteration of Endothelium.** The endothelium of the capillaries in the neurohypophysis of the normal rabbit shows wide regional variations in thickness. After injection of adrenaline, these variations are accentuated, with the formation of numerous peninsular projections or villi, not characteristic of the normal animal (Figs. 16, 18). In the endothelium, of both normal and adrenaline-treated rabbits, many large and small vacuoles similar to those described by PALADE (1953), HARTMANN (1958) and BRETTSCHEIDER (1958) are seen. However, there are no distinct changes in the number or size of these vacuoles after injection of adrenaline.

### *III. Alterations after Injection of Pilocarpine*

In the period of 15 to 30 minutes after injection of pilocarpine, the following changes were produced.

**1. Decrease and Structural Alteration of Secretory Granules.** As already stated, the population of secretory granules shows very large regional variations in the neurohypophysis. For instance, it has been established that the gomorphile

Table. *Effects of Adrenaline and Pilocarpine on Number and Size of Neurosecretory granules*

	Control		Experimental			<i>P</i> <sup>2</sup>
	Mean	S. D. <sup>1</sup>	Mean	S. D.	% of normal	
Adrenaline:						
Number of granules per $\mu^2$ of section	20.0	5.7	26.0	5.9	130.0	< 0.001
Diameter of granules in $m\mu$ . . .	110.5	14.2	132.7	24.8	120.1	< 0.001
Pilocarpine:						
Number of granules per $\mu^2$ of section	20.0	5.7	12.2	4.3	61.0	< 0.001
Diameter of granules in $m\mu$ . . .	110.5	14.2	90.3	20.5	81.7	< 0.001

<sup>1</sup> S.D. = Standard Deviation.

<sup>2</sup> *P* = Probability of observed difference being due to chance, calculated from standard error test for small samples, BANCROFT (1957).

substances are concentrated in the pericapillary region „Verdichtungszone“ (ROMEIS 1940) and in the peripheral parts of the neurohypophysis. As in the case of the adrenaline-treated animals, attention is here directed primarily to the secretory granules in the pericapillary nerve terminals. As early as 15 minutes after injection of pilocarpine, the number of secretory granules is diminished and many optically empty granules appear. As shown in the Table, the decrease amounts to nearly 40%. PALAY (1957) and HARTMANN (1958) reported the appearance of many optically empty granules in dehydrated and histamine-treated rats respectively, and they interpreted this as evidence of hormone release

from the nerve terminals. Apparently, pilocarpine has a similar action on the secretory mechanism of the neurohypophysis. Although in normal rabbits some empty granules can be seen in the nerve terminals, as reported by FUJITA for

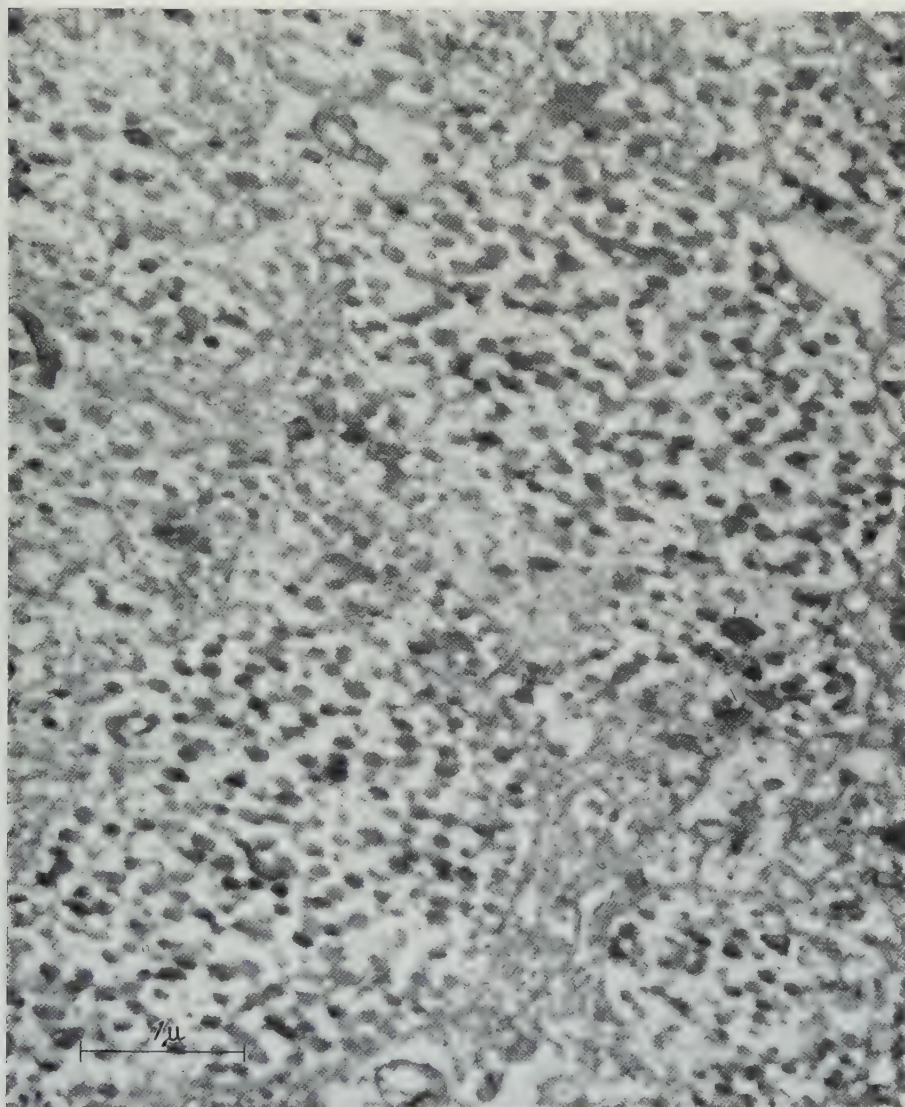


Fig. 19. Nerve fibers at some distance from the pericapillary region with essentially normal complement of neurosecretory granules after injection of pilocarpine. Magnification:  $20,800\times$

the dog (1957), BARGMANN and KNOOP for the cat (1957), and HARTMANN for the rat (1958), the number of empty granules in the normal animal is far less than in the pilocarpine-treated rabbits. On the contrary, in adrenaline-treated rabbits, optically empty granules are very few in number in the nerve terminals. In addition, after pilocarpine treatment, the mean diameter of the granules is significantly reduced (Table). Synaptic vesicles in the nerve terminals seem



by inspection to be increased, but this increase may be only apparent because of the decrease of secretory granules.

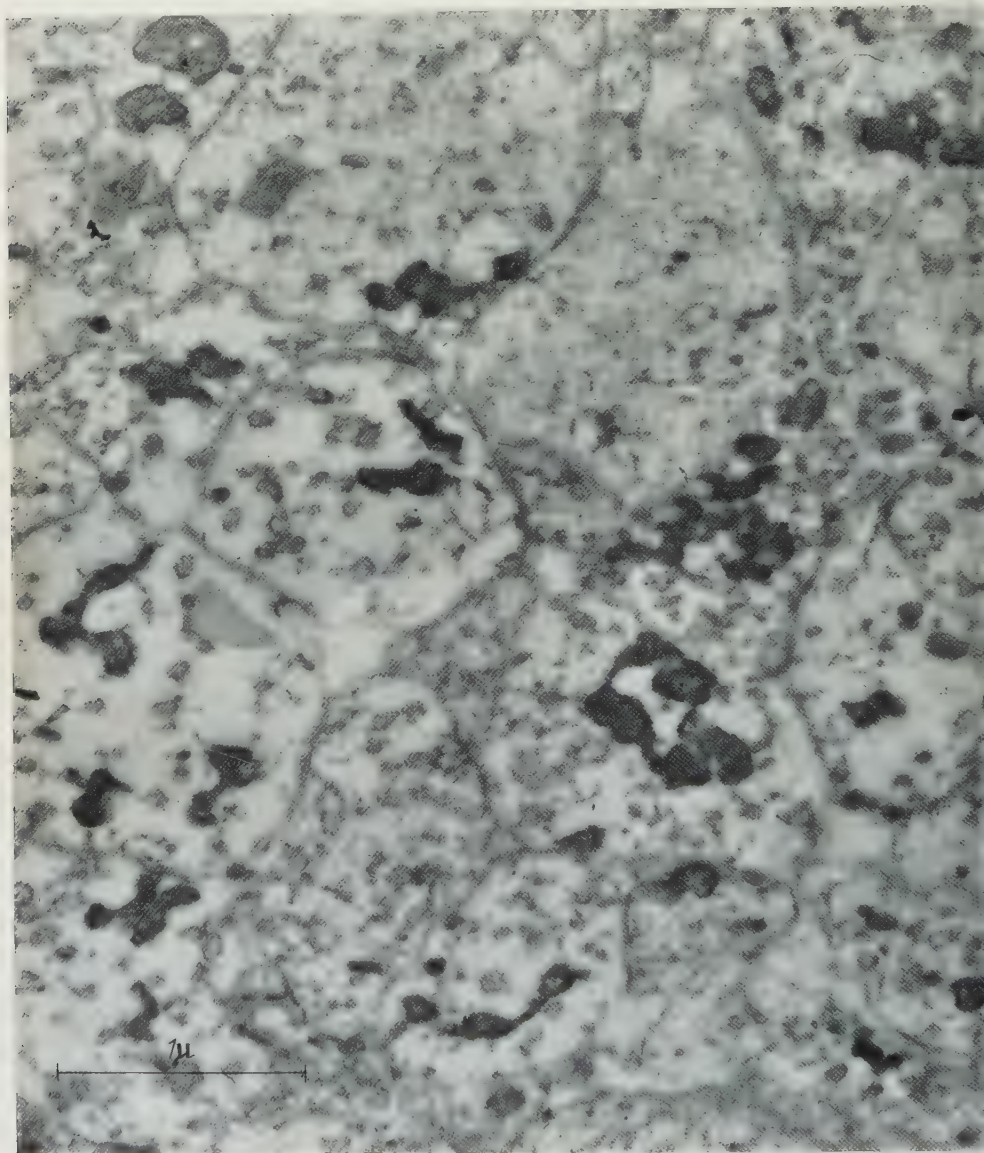


Fig. 20. Mitochondria with very irregular outlines in neurosecretory terminals 20 minutes after injection of pilocarpine. Depletion of neurosecretory granules is also evident. Magnification: 32,200  $\times$

In contrast to the situation in the pericapillary region, nerve fibers some distance from blood vessels retain their normal appearance (Fig. 19).

The above facts suggest that release of neurosecretory material is principally from nerve terminals into blood vessels.

**2. Alteration of Mitochondria** (Figs. 20, 21). The structure of mitochondria is changed within 15 to 30 minutes after injection of pilocarpine. They may be

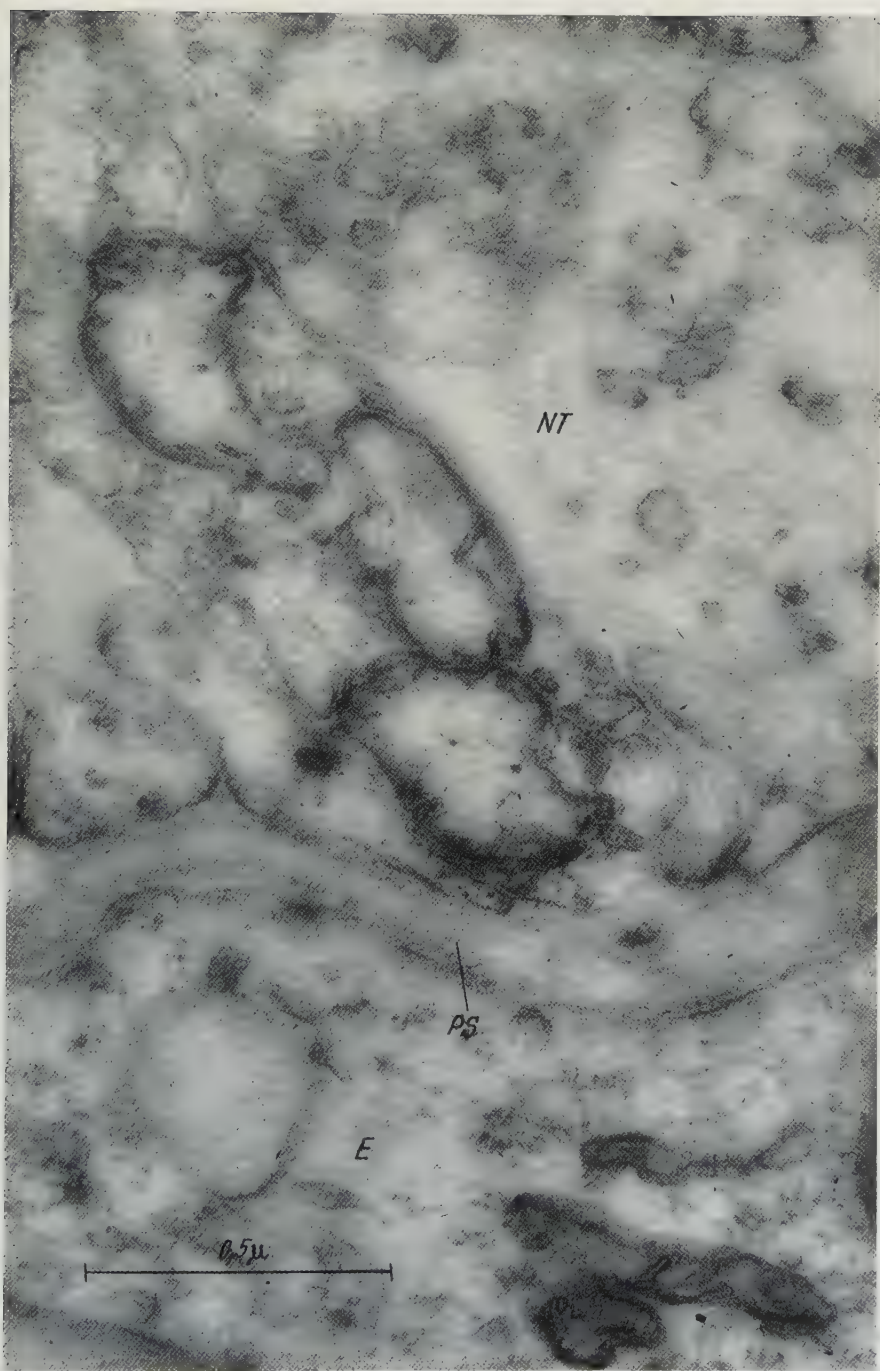


Fig. 21. Three swollen mitochondria in pericapillary nerve terminal 30 minutes after injection of pilocarpine. Mitochondria in the endothelium on the right side of the figure are normal in appearance. PS Pericapillary space, NT Nerve terminal, E Endothelium. Magnification: 80,250 ×



long and slender, round, club-shaped, dumbbell shaped, or swollen. In the large swollen mitochondria, the cristae mitochondriales are almost lost, though these are still present in small mitochondria. HARTMANN (1958) also found swollen mitochondria in the nerve terminals of the neurohypophysis of the rat after injection of histamine. These mitochondrial changes are observed not only in the nerve terminals, but also in the nerve fibers some distance from the perivascular region.

**3. Alteration of Pericapillary Space and Endothelium.** As already stated, the pericapillary space and the endothelium are quite variable in normal animals. Nevertheless, study of normal and pilocarpine-treated rabbits leaves the distinct impression that the pericapillary spaces have a tendency to become narrower after injection of pilocarpine, although some parts are still relatively wide. We found no remarkable changes in the inner and outer basement membranes.

Secretory granules are not found in the pericapillary spaces after injection of pilocarpine. In this case, the secretory granules are considered to lose their recognizable structure as they move into the pericapillary spaces from nerve terminals.

## D. Discussion

### I. Pituicytes

ROMEIS (1940) classified the pituicytes into four types, reticulopituicyte, micro-pituicyte, fibropituicyte and adenopituicyte, and considered that the last-named one secretes the posterior lobe hormone. RANSON and his co-workers (1938, 1939) also described pituicytes as hormone producers. However, as evidence for the neurosecretion theory accumulated, their opinion found fewer adherents. In the present work, secretory granules were found to be absent from the pituicyte of the rabbit, as was reported for other animals on the basis of electron microscope studies by GREEN and VAN BREEMEN (1955), PALAY (1957), DUNCAN (1957), FUJITA (1957), BARGMANN and KNOOP (1957), HARTMANN (1958) and BRETT-SCHNEIDER (1950). It seems increasingly clear that the pituicyte is not responsible for secretion of the posterior lobe hormone.

From observations of the neurohypophysis of the dog in tissue culture, HILD (1954) considered that most pituicytes are identical with protoplasmic astrocytes in other regions of the brain. According to our observations by the electron microscope, pituicytes in the posterior lobe of the rabbit can be divided into three types. Of these, the Type A cell is considered to be identical with the astrocyte which FARQUHAR and HARTMANN (1957) and SCHULTZ, MAYNARD and PEASE (1958) found in the cerebral cortex. Although cytoplasmic organelles are most numerous in the Type B cell, it nevertheless has some similarities to the astrocyte. The observation described here concerning the possible transformations between Type A and Type B cells suggests that the Type B cell is a specific modified type of astrocyte.

HILD (1954) found few oligodendrocytes in the neurohypophysis of the dog in tissue culture. By electron microscopy, it is also very difficult to find the typical oligodendrocyte of FARQUHAR and HARTMANN (1957) and of SCHULTZ, MAYNARD and PEASE (1958).

The Type C cell is identical with the microglia in the cerebral cortex as described by FARQUHAR and HARTMANN (1957) and by SCHULTZ, MAYNARD and PEASE (1958). These cells, with irregular nuclei and dark cytoplasm, show many

variations in form and internal structure. They seem to be quite mobile, and in some cases after injection of adrenaline, Type C cells were present in increased numbers. It seems likely that the number of these cells may increase or decrease rather readily under experimental or even under physiological conditions.

We have never found any lipid inclusions in pituicytes of the rabbit, which PALAY (1957) and HARTMANN (1958) found in pituicytes of the rat. This also suggests a species difference in the neurohypophysis.

By light microscopy, SANO and SAITO (1955) concluded that the pituicytes lie in the parenchymatous region rather far removed from vascular areas, and their processes reaching to the perivascular wall make up the perivascular feet. Electron microscopy confirms this finding, and adds credence to the suggestion that the pituicyte has some role in regulating release of neurosecretory substances from the nerve terminals.

## *II. Adrenaline-Treated Rabbits*

Some pharmacological and physiological reports have been published concerning the effect of adrenaline on neurosecretion. For instance, O'CONNOR and VERNEY (1945), VERNEY (1947), and GIERE and EVERSOLE (1954) reported that adrenaline has a diuretic action which may be due to blocking of the release of posterior pituitary antidiuretic hormone. STEIN and WERTHEIMER (1944), DRILL and BRISTOL (1951), HORRES, EVERSOLE and ROCK (1950), GIERE and EVERSOLE (1953), HOY and ADOLPH (1956) and KIVALO and ARKO (1957) reported polyuria following injection of adrenaline or noradrenaline. According to our observations, dark neurosecretory granules are increased in number and size after injection of adrenaline. We therefore consider that the alterations in fine structure of the neurohypophysis after injection of adrenaline, especially the increase of secretory granules in number and size in the nerve terminal, is due to the blocking of release of secretory material into the blood vessels. GIERE and EVERSOLE (1954) have reported that subcutaneous injection of 20  $\mu\text{g}$ /100 g adrenaline in rats was ineffective in producing a change of urine volume, but 100  $\mu\text{g}$ /140 g was effective. In this study, the subcutaneous injection of 70–100  $\mu\text{g}$ /100 g of adrenaline brought about an increase of secretory granules in the nerve terminals 1–2 hours after treatment. Most of the workers mentioned above also used nearly the same dosages and observed polyuria during 1–3 hours after injection.

In addition to the increase in number and size of secretory granules, mitochondrial changes are evident. It is not possible to decide whether the mitochondrial alterations are produced directly by adrenaline or appear as a secondary effect, following blocking of the release of secretory material. However, it seems permissible to presume that the enzymatic system of the neurosecretory neuron is somehow changed after injection of adrenaline.

The enlargement of the pericapillary space poses also an interesting problem. HARTMANN (1958) referred to it as a "metabolic lake," and considered this space to have some relationship with the secretory function of the organ. In any case, secretory granules stained black by osmium are not found in the space. Hence, the enlargement of the pericapillary space may possibly reflect the deposit of non-osmiophilic secretory substances which are somehow unable to enter the blood



vessel. The endothelium may play some role in blocking the entrance of the secretory substance from the pericapillary space into the blood vessels.

### *III. Pilocarpine-Treated Rabbits*

No previous electron microscopic work dealing with the effect of pilocarpine on neurosecretion has been found. However, PICKFORD (1939), FUGO (1944), and MIRSKY, STEIN and PAULISCH (1954) found that acetylcholine, yohimbine and histamine stimulate the release of posterior lobe hormone from the neurohypophysis. These drugs are parasympathetic stimulators resembling pilocarpine. By light microscopy, SANO, TAMIYA and FUJITA (1956) observed a remarkable decrease of gomorphile substances in the neurohypophysis of the dog after multiple injections of pilocarpine.

From our observations of electron micrographs, it is evident that pilocarpine treatment is followed by depletion of secretory granules with the appearance of many optically empty granules in the nerve terminals and changes in mitochondrial structure and in the pericapillary spaces.

PALAY (1957) and HARTMANN (1958) have already described the depletion of secretory granules and appearance of optically empty granules in the nerve terminal in dehydrated and histamine-treated rats, respectively. These have been considered as cases in which releases of posterior lobe hormone are stimulated. Our work with pilocarpine suggests a similar action of this drug in stimulating the release of posterior lobe hormone from nerve terminals into blood vessels.

The appearance of many optically empty granules is also very interesting, because it suggests that the active hormonal agent is probably in the central dense portion of the granule, and this portion is somehow transported into the pericapillary space and thence into the blood vessel, becoming undetectable by present morphological methods in the process.

In normal rabbits some empty granules were noted, as found by BARGMANN and KNOOP (1957), FUJITA (1957), PALAY (1957) and HARTMANN (1958) in other animals, and this phenomenon is considered to be related to normal physiological release of hormone or carrier substance from the nerve terminals.

### **Summary**

1. The fine structure of the neurohypophysis in normal, adrenaline-treated and pilocarpine-treated rabbits has been studied, using the electron microscope. The normal structure of the nerve terminal and pericapillary region is quite similar to that of the rat as described by PALAY (1957) and HARTMANN (1958).

2. Pituicytes are significantly different, however, and are classified into three types. The first one (Type A) is identical with the astrocyte of FARQUHAR and HARTMANN (1957) and of SCHULTZ, MAYNARD and PEASE (1958). This type cell has a round or oval nucleus of low electron density and abundant watery cytoplasm with few formed elements.

3. The second type (Type B) is considered to be an atypical astrocyte. This type cell has a nucleus closely resembling that of Type A, but with abundant cytoplasm containing relatively numerous formed elements. The inverse relationship between relative numbers of Type A and Type B cells in a given gland suggests the possibility of one type being readily transformed into the other under normal

conditions. The last type (Type C) has a dark, irregular nucleus and dense cytoplasm with many cell organelles. This cell is structurally identical with the microglia of FARQUHAR and HARTMANN, and of SCHULTZ, MAYNARD and PEASE. A typical oligodendrocyte is not found. No secretory granules are present in pituicytes. The pituicytes are in contact with nerve fibers with a double membrane intervening, and sometimes enclose nerve fibers in invaginations of their cytoplasm. The cell bodies of the pituicytes are located in the parenchymatous region far from blood capillaries, and their processes, along with the nerve terminals, reach to the outer basement membrane of the pericapillary space.

4. During 1—2 hours after injection of adrenaline there was found to be a statistically significant increase in number and size of secretory granules, as well as structural changes of mitochondria in the nerve terminals, enlargement of the pericapillary space and endothelial alterations. These phenomena are considered to reflect a blocking of the release of secretory material after injection of adrenaline.

5. After injection of pilocarpine, a statistically significant decrease in number and size of neurosecretory granules, plus the appearance of many optically empty granules, structural changes of mitochondria and attenuation of the pericapillary space were observed. These phenomena are considered to be related to an acceleration of the release of secretory granules after injection of pilocarpine.

### References

- ANDERSON, E., and W. HAYMAKER: Elaboration of hormones by pituitary cells growing *in vitro*. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **33**, 313—316 (1935/36).
- ARKO, H., E. KIVALO and U. K. RINNE: Neurosecretory substance in the neurohypophysis of the rat. *Ann. Med. exp. Fenn.* **35**, 404—408 (1957).
- BAEZ, S., A. MAZUR and E. SHORR: Role of the neurohypophysis in ferritin-induced anti-diuresis. *Amer. J. Physiol.* **169**, 123—133 (1952).
- BANCROFT, H.: Introduction to biostatistics, pp. 74—79. New York: Paul B. Hoeber 1957.
- BARGMANN, W.: Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. *Z. Zellforsch.* **34**, 610—634 (1949).
- , and A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an der Neurohypophyse. *Z. Zellforsch.* **46**, 242—251 (1957).
- — and A. THIEL: Elektronenmikroskopische Studie an der Neurohypophyse von *Tropidonotus natrix* (mit Berücksichtigung der Pars intermedia). *Z. Zellforsch.* **47**, 114—126 (1957).
- BRETTSCNEIDER, H.: Die Feinstruktur des Nervösen Parenchyms von Infundibulum und Neurohypophyse. II. Die Neurosekretion. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **64**, 575—590 (1958).
- BUCY, C. P.: The pars nervosa of the bovine hypophysis. *J. comp. Neurol.* **50**, 505—519 (1930).
- BURN, J. H., L. H. TRUELOVE and J. BURN: The antidiuretic action of nicotine and of smoking. *Brit. med. J.* **1945 I**, 403—406.
- DE BODO, R. C.: The antidiuretic action of morphine and its mechanism. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **82**, 74—85 (1944).
- , and K. F. PRESCOTT: The antidiuretic action of barbiturate (phenobarbital, amytal, pentobarbital) and the mechanism involved in the action. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **85**, 222—233 (1945).
- DEXTER, D., H. B. STONER and H. N. GREEN: The release of posterior pituitary antidiuretic hormone by adenosine triphosphate. *J. Endocr.* **11**, 142—159 (1954).
- DRILL, V. A., and W. R. BRISTOL: Comparison of water and saline hydration on diuretic action of sympathomimetic agents. *Endocrinology* **49**, 589—595 (1951).
- DUNCAN, D.: An electron microscope study of the neurohypophysis of a bird, *Gallus domesticus*. *Anat. Rec.* **125**, 457—472 (1956).



- FARQUHAR, M. G., and J. F. HARTMANN: Neuroglial structure and relationships as revealed by electron microscopy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **16**, 18—39 (1957).
- FISHER, C., W. R. INGRAM and S. W. RANSON: Diabetes insipidus and the neurohormonal control of water balance. A contribution to the structure and function of the hypothalamico-hypophysial system. Ann. Arbor, Michigan: Edwards Brothers 1938.
- FUGO, N. W.: The antidiuretic action of yohimbine. *Endocrinology* **34**, 143—148 (1944).
- FUJITA, H.: Electron microscopic observations on the neurosecretory granules in the pituitary posterior lobe of dog. *Arch. hist. jap.* **12**, 165—172 (1957).
- , M. KANO, I. KUNISHIMA and T. KIDO: Electron microscopic observation on the adrenal medulla of the chick after injection of insulin. *Arch. hist. jap.* **18**, 411—419 (1959).
- GIERE, F. A., and W. J. EVERSOLE: Excretion of water and electrolytes in hydrated rats treated with adrenal medullary hormones. *Fed. Proc.* **12**, 51 (1953).
- — Effects of adrenal medullary hormones on antidiuretic substance in blood serum. *Science* **120**, 395—396 (1954).
- GINSBURG, M., and H. HELLER: Antidiuretic activity in blood obtained from various parts of the cardiovascular system. *J. Endocr.* **9**, 274—282 (1953).
- GREEN, J. D., and V. L. VAN BREEMEN: Electron microscopy of the pituitary and observations on neurosecretion. *Amer. J. Anat.* **97**, 177—288 (1955).
- HARTMANN, J. F.: Electron microscopy of the neurohypophysis in normal and histamine-treated rats. *Z. Zellforsch.* **48**, 291—308 (1958).
- HILD, W.: Das morphologische, kinetische und endokrinologische Verhalten von hypothalamischem und neurohypophysärem Gewebe *in vitro*. *Z. Zellforsch.* **40**, 257—312 (1954).
- HORRES, A. D., W. J. EVERSOLE and M. H. ROCK: Adrenal medullary hormones in water diuresis. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **75**, 58—61 (1950).
- HOY, P. A., and E. F. ADOLPH: Diuresis in response to hypoxia and epinephrine in infant rats. *Amer. J. Physiol.* **187**, 32—40 (1956).
- KIVALO, E., and H. ARKO: The effect of nor-adrenaline and acetylcholine on water diuresis and neurosecretory substance of the rat. *Ann. Med. exp. Fenn.* **35**, 398—403 (1957).
- LATTA, H., and J. F. HARTMANN: Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **74**, 436—439 (1950).
- MAGOUN, H. W., C. FISHER and S. W. RANSON: The neurohypophysis and water exchange in the monkey. *Endocrinology* **25**, 161—174 (1939).
- MIRSKY, I. A., M. STEIN and G. PAULISH: The secretion of an antidiuretic substance into the circulation of rats exposed to noxious stimuli. *Endocrinology* **54**, 491—505 (1954).
- O'CONNOR, W. J., and E. B. VERNEY: Effect of increased activity of sympathetic system in inhibition of water diuresis by emotional stress. *Quart. J. exp. Physiol.* **33**, 77—90 (1945).
- PALADE, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. *J. exp. Med.* **95**, 285—298 (1952).
- Fine structure of blood capillaries. *J. appl. Physics* **24**, 1424 (1952).
- PALAY, S. L.: The fine structure of the neurohypophysis. In *Ultrastructure and Cellular Chemistry of Neural Tissue*, edit. by H. WAELSCH. New York: Paul P. Hoeber 1957.
- PICKFORD, M.: The inhibitory effect of acetylcholine on water diuresis in the dog, and its pituitary transmission. *J. Physiol. (Lond.)* **95**, 226—238 (1939).
- , and J. A. WATT: A comparison of the effect of intravenous and intracarotid injections of acetylcholine in the dog. *J. Physiol. (Lond.)* **114**, 333—335 (1951).
- PORTER, K. R., and J. BLUM: A study in microtomy for electron microscopy. *Anat. Rec.* **117**, 685—712 (1953).
- RANSON, S. W., C. FISCHER and W. R. INGRAM: The hypothalamohypophyseal mechanism in diabetes insipidus. *Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis.* **17**, 410—432 (1938).
- ROMEIS, B.: Hypophyse. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. VI/3, S. 389—474. Berlin: Springer 1940.
- SANO, Y.: Über das Gitterfaserbild im Hypothalamus-Hypophysensystem des Menschen. *Folia anat. jap.* **26**, 203—219 (1954).

- SANO, Y., and A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am kaudalen neurosekretorischen System von *Tinca vulgaris*. *Z. Zellforsch.* **49**, 464—492 (1958).
- , and O. SAITO: On the neuroglial elements in the hypothalamico-hypophyseal system of dog and cat. *Acta anat. nipponica* **31**, 79 (1956).
- SCHARRER, E.: Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen. I. Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische. *Z. vergl. Physiol.* **7**, 1—38 (1928).
- SCHULTZ, R. L., E. A. MAYNARD and D. C. PEASE: Electron microscopy of neurons and neuroglia of cerebral cortex and corpus callosum. *Amer. J. Anat.* **100**, 369—387 (1957).
- VERNEY, E. B.: The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc. roy. Soc. B* **135**, 26—106 (1947).

HISAO FUJITA, M.D.,

Department of Anatomy, University of Minnesota, Minneapolis, U.S.A.

Prof. J. FRANCIS HARTMANN, Ph.D.,

Department of Anatomy, University of Minnesota, Minneapolis 14, U.S.A.



Institut d'Anatomie Comparée et d'Histologie de l'Université de Turin (Italie)  
(Directeur: Prof. Dr. V. MAZZI)

LE REIN DU TRITON CRÊTÉ  
(*TRITURUS CRISTATUS CARNIFEX*. LAUR.)  
ÉTUDE MORPHOLOGIQUE, CYTOLOGIQUE ET  
CYTOCHIMIQUE\*

Par

ALBERTO PEYROT et GIOVANNA MASSIMELLO

Avec 23 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 10 Avril 1961)

Introduction

Das une note préliminaire, l'un de nous (PEYROT, 1960) avait décrit la distribution topographique d'un certain nombre de systèmes enzymatiques dans les différents segments du néphron chez le Triton crêté, et avait démontré histo-chimiquement pour la première fois — du moins à ce qui nous résulte — la présence d'activités phosphatasiques spécifiques (glucose 6-phosphatase et adenosine-triphosphatase) et succinodéshydrogénasique dans le rein d'un Amphibien.

Ces observations, jointes à celles effectuées sur le plan biochimique par FERRERI (1960), représentaient l'étude préliminaire indispensable en vue de procéder à des recherches bio-histochimiques sur le comportement de quelques systèmes enzymatiques du rein de Tritons soumis à des conditions expérimentales différentes (FERRERI et PEYROT, 1960; FERRERI et PEYROT, 1961); elles figuraient aussi dans un plus vaste programme d'études sur le rein des Vertébrés inférieurs aux Mammifères, études actuellement en cours dans notre Institut (Cf. à ce propos: MAZZI, 1958; MAZZI et PEYROT, 1961).

Les recherches de PEYROT (1960) avaient fait ressortir, entre outre, qu'il y aurait eu intrêrêt à étudier à fond les caractéristiques histologique et cytologiques du néphron Triton crêté. Les données de la littérature que nous possédons nous invitent en effet, à penser que jusqu' à présent on connaissait mal ou du moins on n'avait jamais étudié de façon organique et complète ce néphron.

HUFNER (1866) décrivit le premier la morphologie du rein et la succession des différents segments du néphron des Anoures et SPENGEL (1876) donna les premiers détails morphologiques et histologiques sur le rein des Urodèles dans une vaste recherche sur le système urogénital des Amphibiens, recherche où l'auteur étudiait quelques espèces typiques des trois groupes de cette classe: Gymnophiones, Urodèles et Anoures.

A la même époque et lors des années successives de nombreux auteurs consacrèrent leur attention au rein des Amphibiens (entre autres HEIDENHAIN, 1874; NUSSEBAUM, 1878 *a* et *b*, 1886; HEIDINGER, 1888; VIGNON, 1897; MEVES, 1899; REGAUD et POLICARD, 1901; REGAUD, 1908—1909, POLICARD, 1907—1910; BERTELLI, 1927—1929; TURCHINI, 1922) mais leurs études portèrent essentiellement sur les Anoures et sur certains problèmes de cytologie (chondriome, appareil de Golgi) ou d'histophysiologie (fonction du glomérule et du tube).

La recherche à la fois vaste et complète de CHASE (1923) sur *Necturus maculosus* représente donc une étape fondamentale de nos connaissances sur les reins des Urodèles, notamment en ce

\* Recherche conduite et publiée avec une contribution du Consiglio Nazionale delle Ricerche.

qui concerne la morphologie et l'histophysiologie du tube rénal. En 1925 JASSWOIN étudie la cytophysiologie du néphron des Amphibiens (et du Triton en particulier), mais son attention est dirigée surtout vers le segment à bordure en brosse. Dans les années qui suivent, après les observations anatomo-topographiques de DE BEAUMONT (1929) sur *Triton cristatus* et de FRANCIS (1934) sur *Salamandra maculosa*, et celles morphogénétiques de GRAY (1932) sur *Triton vulgaris*, LAMBERT (1936) définit quelques caractères histologiques du rein de *Salamandra maculosa*. La description de cet auteur est cependant peu détaillée et figure de façon presque marginale dans une vaste recherche d'histophysiologie rénale qui est conforme au type de recherches effectuées par la plus part des auteurs du début du siècle. Ceux-ci concentrèrent en effet, essentiellement leur efforts vers les problèmes de la capacité filtratoire du glomérule, de la composition du filtrat glomérulaire et de la fonction du tube rénal (sécrétion active de substances diverses ou simple absorption).

Le fait d'examiner cette série exceptionnellement nombreuses de recherches sortirait cependant du cadre du présent travail; nous renvoyons donc le lecteur aux mises au point de GERARD et CORDIER (1934), de REMOTTI (1936) et de GERARD (1936—1954).

Lors de ces dernières années, les recherches, menées dans deux nouvelles directions, l'histochimie et la microscopie électronique, ont contribué pour le rein aussi, à accroître nos connaissances et faciliter la solution de nombreux problèmes. L'attention des chercheurs dans ces deux domaines a cependant été dirigée de préférence, au moins au début, vers les Mammifères.

Les recherches histochimiques ont notamment confirmé la possibilité de diviser chez le Mammifères (LONGLEY et FISHER, 1954; MANGIONE, 1957) le segment à bordure en brosse en deux tronçons ( $P_1$  et  $P_2$ ), ceci d'après des différences morphologiques. Cette possibilité avait été envisagée par EDWARDS (1933, *a* et *b*), puis confirmée par GRAFFLIN (1937) et par FOOTE et GRAFFLIN (1938—1942).

Dans le cadre de cette nouvelle tendance, les recherches sur les enzymes ont occupé une place considérable. WILMER (1944) étudia le premier la phosphatase alcaline rénale chez plusieurs Vertébrés. Après lui, de nombreux auteurs ont constaté que le rein des Vertébrés est le siège de l'activité d'un très grand nombre de systèmes enzymatiques (nous pouvons citer entre autres les travaux de SOULAIRAC, 1948; PADYKULA, 1952; RICHTERICH, 1952; CHIQUOINE, 1953—1955; CHESIK, 1953; LONGLEY et FISHER, 1954; ERANKÖ et LEHTO, 1954; MANGIONE, 1957; WACHSTEIN, 1946—1952—1955; STRAUS, 1956; NOVIKOFF, 1957; SPATER, NOVIKOFF et MASEK, 1958).

Chez les Vertébrés inférieurs aux Mammifères, en plus des recherches histochimiques approfondies de GABE (1957 sur *Hippocampus guttulatus*; 1959 *a* sur *Vipera aspis*; 1959 *b* sur *Protopterus annectens*) et de MAZZI (1958 sur *Cyprinus carpio*), quelques auteurs ont étudié les enzymes du rein (LONGLEY et FISHER, 1954; LONGLEY, 1956; PEYROT, 1960; MAZZI et PEYROT, 1961). D'autres auteurs ont au contraire étudié chez plusieurs Téléostéens et Amphibiens bien qu'au point de vue exclusivement enzymatique, aussi bien le rein que d'autres organes.

Les recherches de ces auteurs se sont limitées à l'activité phosphatasique alcaline non spécifique (DELSOL, 1953; ARVY et GABE, 1953; ARVY, 1954) ou à l'activité phosphatasique acide et estérasique non spécifiques (ARVY, 1957; GLENNER et BURSTONE 1958).

On a précisé à l'aide du microscope électronique la structure de la paroi viscérale de la capsule de BOWMANN (PEASE 1955a) et de l'endothélium des capillaires (HAM, 1957).

L'ultra-structure des différents segments du tube rénal a fait l'objet d'une attention particulière (entre autres SJÖSTRAND et RHODIN, 1953; PEASE, 1959—1955 *b* et *c*; RHODIN, 1958; MAXIMOW et BLOOM, 1957), et on a apporté un soin tout spécial à l'étude de la conformation de la bordure en brosse et de la disposition des membranes basales et du chondriome.

En plus des recherches consacrées aux Mammifères, quelques auteurs ont étudié l'ultra-structure du rein des Amphibiens (PAK POY, 1957; YAMADA, 1960, sur la grenouille; BARGMANN et coll., 1955, sur *Xenopus laevis* et *X. muelleri*), des Reptiles (ANDERSON, 1960; ANDERSON et BEAMS, 1958; PAK POY, 1959) et des Oiseaux (PRESTAGE et BEAMS, 1957).

Bien que nombreuses, ces recherches ont encore besoin d'être précisées, notamment en ce qui concerne les Vertébrés inférieurs aux Mammifères; elles permettront de résoudre les doutes qui existent encore aussi bien quant à la philogénèse (WILMER, 1960), que quant à la physiologie du néphron.



## Matériel et Techniques

L'étude a porté sur quarante et un exemplaires de *Triturus cristatus carnifex* LAUR. (vingt et deux ♂♂ et dixneuf ♀♀).

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation et leur rein immédiatement prélevé. Les pièces ont été fixées par les liquides de HELLY, de SANFELICE, de BOUIN et de CARNOY. L'inclusion a été faite à la celloïdine paraffine selon PETERFI. Pour l'étude topographique les pièces ont été débitées en coupes séries de  $7\ \mu$  d'épaisseur et colorées par la méthode allochromique de LILLIE et par la mélange de GALGANO. Pour mettre en évidence le chondriome nous avons choisi la coloration de ALTMANN-KULL sur les pièces fixées par le liquide de CHAMPY et post-chromisées pendant huit jours à la température du laboratoire.

Parmi les méthodes histochimiques nous avons employé la réaction au P.A.S. avec contrôle par la diastase salivaire; la méthode de RITTER et OLESON; celle de STEEDMANN au bleu alcian pour la recherche des mucopolysaccharides acides; celle de ADAMS et SLOPER au bleu alcian pour la recherche des groupement —SS—; le bleu de Toluïdine à des  $pH$  variables de 4,5 à 8; la méthode de BRACHET au vert de méthyle-pyronine; la coloration à la fuchsine-paraldéhyde (FP).

L'étude histochimique des activités enzymatiques a été faite sur des coupes obtenues au criostate de PEARSE provenant de matériel non fixé (glucose 6-phosphatase; adénosine-triphosphatase; succino-déshydrogénase et 5-nucléotidase), ou provenant de matériel fixé au formol-calcium à  $0^{\circ}$ — $4^{\circ}$  C. (phosphatase alcaline et acide non spécifiques, adénosino-triphosphatase, lipase), inclus en gélatine ou gardés à  $0$ — $4^{\circ}$  C. dans une solution de gomme arabique à 1 p. 100 en saccharose 0,88 M. selon les indications de HOLT (1959)<sup>1</sup>.

Nous avons employé les méthodes suivantes:

1. Méthode de GOMORI, modifiée par DANIELLI, au  $\beta$ -glycérophosphate, pour la mise en évidence de la phosphatase alcaline non spécifique.

2. Méthode de GOMORI au  $Pb(NO_3)_2$  pour la mise en évidence de la phosphatase acide non spécifique.

3. Méthode de CHIQUOINE au  $Pb$  pour la mise en évidence de la glucose 6-phosphatase. Nous avons employé à ce propos le glucose 6-phosphate de Potassium obtenu par la conversion du sel de Baryum (Sigma ou Fluka) selon les indications de CHIQUOINE, 1953. Pour préciser le caractère spécifique de la réaction, nous avons employé soit des coupes de matériel non fixé, soit des coupes de matériel fixé au formol-calcium; de plus, dans les deux cas nous avons effectué un contrôle, au même conditions de  $pH$  et de température, en employant comme substrat le  $\beta$ -glycérophosphate.

4. Méthode de WACHSTEIN et MEISEL au  $Pb$  pour la recherche histochimique de l'adénosine-triphosphatase en employant comme substrat le sel de Na de l'acide adénosine 5'-triphosphorique (Sigma ou Fluka).

5. Méthode de GOMORI au Ca et méthode de WACHSTEIN et MEISEL au  $Pb$  pour la 5-nucléotidase en employant comme substrat l'acide adénosine 5-phosphorique de la levure (Sigma) et celui du muscle (Fluka) et l'acide adénosine 3-phosphorique (Bayer)<sup>2</sup>.

6. Méthode de NACHLAS et SELIGMAN pour la lipase en employant comme substrat l'acétate de  $\beta$ -naphtyle et un sel de diazonium préparé extemporanément par diazotation de la benzidine.

7. Méthode de SHELTON et SNAIDER au néotétrazolium pour la succino-déshydrogénase.

Lors de l'application des différentes méthodes, nous avons suivi les indications de GOMORI (1953) et de PEARSE (1953; 1960).

Nous avons effectué également plusieurs dissections à la loupe binoculaire pour préciser les rapports existant entre le rein, les feuillets mésentériques et les organes voisins. Afin de compléter cette étude, nous avons fixé *in toto* au liquide de BOUIN la région lombaire du tronc de deux animaux (un ♂ et une ♀). Les pièces ont été incluses à la celloïdine, débitées en coupes à  $60\ \mu$  et colorées à l'hémalum-éosine.

<sup>1</sup> Nous avons eu les résultats les plus intéressants en plongeant pendant quelques instants dans la solution de saccharose et de gomme les pièces non fixées avant de les débiter en coupes au criostate. La solution de HOLT se conserve mieux et plus longtemps dans le réfrigérateur avec quelques cristaux de thymol.

<sup>2</sup> La maison Bayer ne fournit aucune indication sur l'origine de ce produit.

## Observations personnelles

### I. Caractères morphologiques

Nos observations sont en harmonie en ce qui concerne la morphologie et la position du rein, avec celles formulées par SPENGLER (1786) sur une espèce voisine (*Triton taeniatus*) et celles formulées par DE BEAUMONT (1929) qui avait étudié la même espèce que nous.

Les reins, sont très adhérents à la paroi dorsale du corps dans la moitié caudale de la cavité abdominale où ils forment deux masses allongées. Plus compacts à leur partie moyenne et caudale (*rein pélvien*), ils amincissent à leur partie antérieure, formant ainsi une mince bandelette (*rein génital*: WIEDERSHEIM, 1888).

En nombre réduit et disposés en rangée, les néphrons du rein génital prennent chez le mâle des connexions avec la gonade, tandis que, chez la femelle, ils ne semblent guère différer de ceux du rein pelvien.

Les collecteurs ont une allure différente dans les deux sexes et dans les différentes régions du rein. Chez le mâle les collecteurs du rein génital servent de canalicules déférents et mettent en communication les déférents du testicule avec le canal de WOLFF; les deux ou trois premiers collecteurs de la région antérieure du rein pelvien sont courts et débouchent dans le canal de WOLFF au niveau où ils sortent du rein. Les collecteurs de la région moyenne et caudale s'allongent, au contraire, pour déboucher tous ensemble à l'extrémité du canal de WOLFF.

Chez la femelle les collecteurs du rein génital — lequel n'a aucun rapport avec la gonade — et ceux de la partie antérieure du rein pelvien ont une allure semblable à ceux du mâle; à la partie caudale les collecteurs sont courts et débouchent isolément dans le canal de WOLFF à différents niveaux.

Les reins sont enveloppés par un feuillet mésentérique qui se prolonge latéralement en une membrane qui renferme les collecteurs et les canaux de WOLFF et de MÜLLER et qui unit, suivant la médiane, les deux reins tout en englobant les gros vaisseaux (artère aorte et veine cave inférieure).

Plusieurs membranes très minces partent dorsalement du feuillet mésentérique — lequel est pigmenté — et suspendent le rein à la région dorsale du corps en se prolongeant dans le péritoine pariétal qui est, lui aussi, pigmenté. Les mésentères génitaux, qui enveloppent les gonades, partent du bord médial du rein génital.

La circulation artérielle est assurée par des branches segmentales de l'aorte. La circulation veineuse est du type portal. Les veines portales rénales (qui naissent de la bifurcation de la veine caudale) cheminent le long du bord dorso-latéral du rein auquel elles envoient de nombreuses branches qui s'y capillarisent. Le sang veineux est ensuite drainé par la veine cave postérieure située entre les deux reins, en position ventrale par rapport à l'aorte (Fig. 1 et 2).

Vu en coupe transversale, le rein a une forme plus ou moins ovale.

Le tissu conjonctif situé entre les néphrons est peu abondant; on peut cependant remarquer quelques différences suivant la position qu'il occupe: dans le rein génital les néphrons sont plus lâches et le tissu conjonctif plus abondant; dans le rein pelvien, les néphrons sont au contraire très denses et le tissu conjonctif très limité.

De même que chez d'autres Amphibiens anoures et urodèles (POLICARD, 1910; CHASE, 1932; DAWSON, 1927; LAMBERT, 1936), on observe dans le néphron du Triton — en plus du glomérule — cinq segments de longueur et de diamètre

inégaux: le collet, le segment à bordure en brosse, le segment intermédiaire, le segment à bâtonnets, et le segment d'union qui se prolonge en un collecteur.

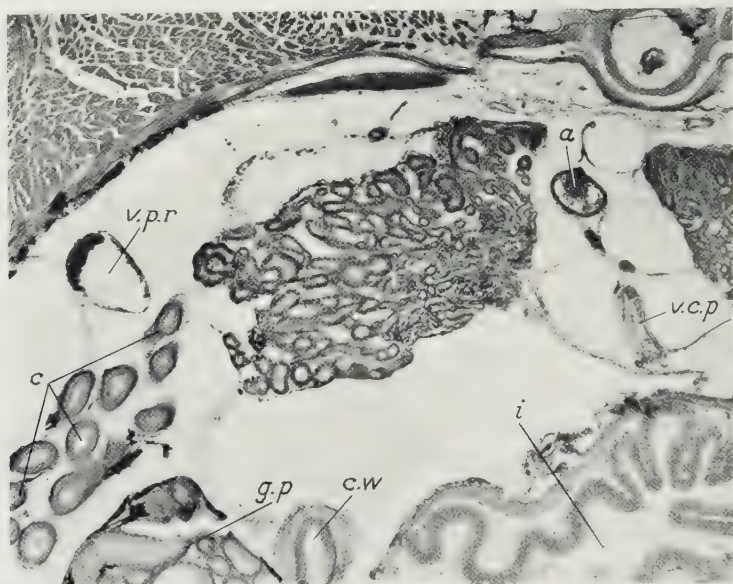


Fig. 1. Coupe transversale au niveau du rein pelvien chez le mâle. *a* aorte; *v.c.p.* veine cave postérieure; *v.p.r.* veine portale rénale de droite; *c* collecteurs; *c.w.* canal de Wolff; *i* intestin; *g.p.* glande pelvienne. BOUIN; inclusion à la celloïdine; hémalum — éosine. 32 ×

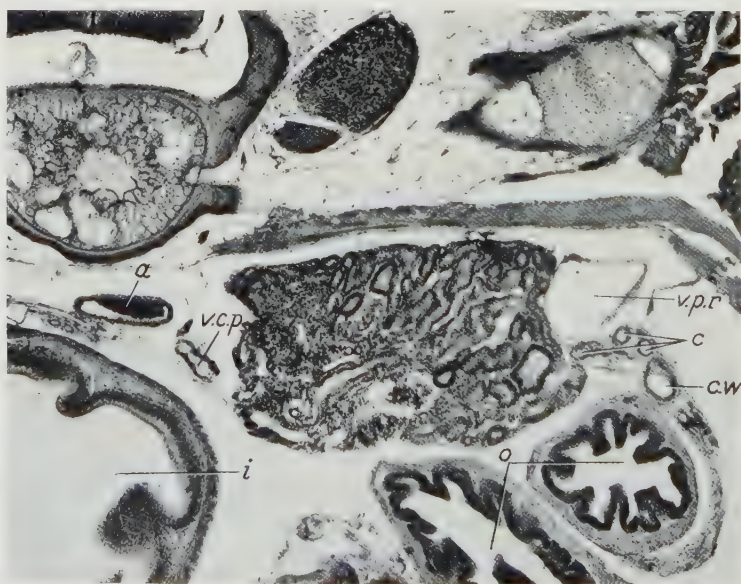


Fig. 2. Coupe transversale au niveau du rein pelvien chez la femelle. *a* aorte; *v.c.p.* veine cave postérieure; *v.p.r.* veine portale rénale de gauche; *c* collecteurs; *c.w.* canal de Wolff; *o* oviducte; *i* intestin. BOUIN; inclusion à la celloïdine; hémalum — éosine. 32 ×



La disposition topographique des différents segments dans le rein, disposition que l'un d'entre nous (PEYROT, 1960) a déjà décrite chez le Triton, correspond à celle observée par CHASE (1923) chez *Necturus*.

Vu en coupe trasversale, le rein apparaît divisé en deux régions bien distinctes (Fig. 1 et 2), sans pourtant être séparées par une limite très nette: dans la région ventrale on trouve presque exclusivement des glomérules et des segments à bâtonnets, dans celle dorsale, on trouve au contraire les segments à bordure en brosse. Les collets et les segments intermédiaires unissent ces deux régions, tandis que les segments d'union et les collecteurs sont situés dans la région ventrale d'où ils se dirigent vers le bord dorsal au niveau duquel ils sortent du rein.

Les néphrostomes sont situés exclusivement sur la face ventrale du rein.

Nous n'avons pas effectué de reconstruction plastique, mais l'examen de coupes sériées nous a permis d'identifier avec certitude la succession des segments du néphron. Le collet cilié, rectiligne ou à peine ondulé est assez long; partant du glomérule ventral il se dirige dorsalement plus ou moins au même niveau, puis passe brusquement dans le segment à bordure en brosse. Celui-ci est certainement le plus long de tout le néphron et celui qui a aussi le diamètre le plus élevé<sup>1</sup>. Il est tortueux et présente des boucles étroites et lâches. Il se dirige en suite vers la région médiane du rein où son diamètre diminue brusquement et continue dans le segment intermédiaire cilié, lequel est généralement assez court. Ce dernier l'unit au segment à bâtonnets qui est ventral. Le segment à bâtonnet s'enroule à son tour en forme de spire assez étroites entre les glomérules, dans la région la plus ventrale du rein, puis il se prolonge en un collecteur, lequel se dirige vers la région dorsale. Les collecteurs de chaque néphron s'unissent pour former des canaux excréteurs plus grands qui cheminent d'abord longitudinalement, puis sortent du rein.

Les canaux excréteurs présentent un dimorphisme sexuel très accentué<sup>2</sup> et subissent, suivant le cycle sexuel, des modifications saisonnières particulièrement marquées chez le mâle (Fig. 3 et 4).

## II. Caractères histologiques et histochimiques

**a) Le glomérule.** Chez le Triton, comme chez les Amphibiens en général, le glomérule est assez grand; situé dans la région ventrale du rein, il occupe une position plus ou moins superficielle.

La basale et de fines granulations peu abondantes dans les cellules de la capsule de BOWMAN, donnent une réaction P.A.S. positive. Le chondriome est formé de rares et tout petits mitochondres.

Dans les conditions de notre travail nous n'avons pu observer qu'une faible activité 5-nucléotidasique qu'il est possible de déceler à l'aide de la méthode de WACHSTEIN et MEISEL au Pb en employant l'acide adénosin 3-phosphorique en tant que substrat.

Dans le rein génital du mâle les glomérules (Fig. 5) ont un aspect différent de ceux du rein pelvien: le feuillet pariétal de la capsule de BOWMAN est formé de cellules cubiques et le réseau admirable des capillaires est extrêmement dense;

<sup>1</sup> En parlant de diamètre du néphron, nous considérerons, sauf indications contraires, le diamètre extérieur et non celui de la cavité.

<sup>2</sup> Cf. à ce propos les revues de ARON (1924) de DE BEAUMONT (1929) et de GALGANO (1944).

dans l'espace urinaire des néphrons situés à la partie le plus antérieure, on observe souvent des spermatozoïdes.

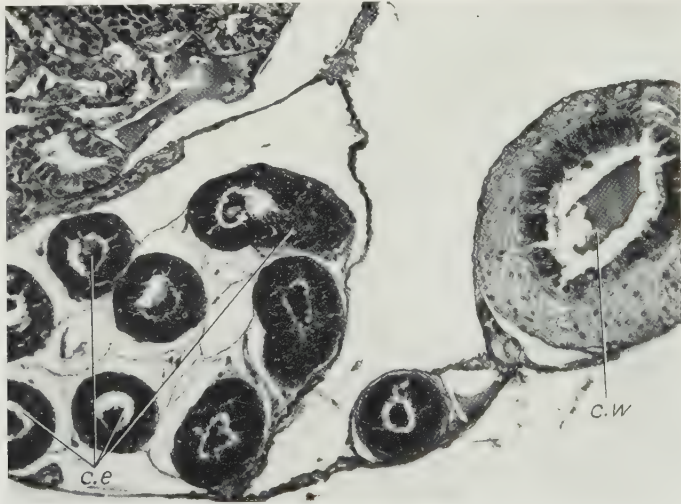


Fig. 3. Canaux excréteurs (*c.e.*) et canal de Wolff (*c.W.*) au printemps, chez le mâle. L'épithélium des canaux excréteurs est très développé; ses cellules sont pleines de granulations P.A.S. positives; le canal de Wolff a une épaisse paroi conjonctive. SANFELICE; coloration allochromique de LILLIE. 80 ×

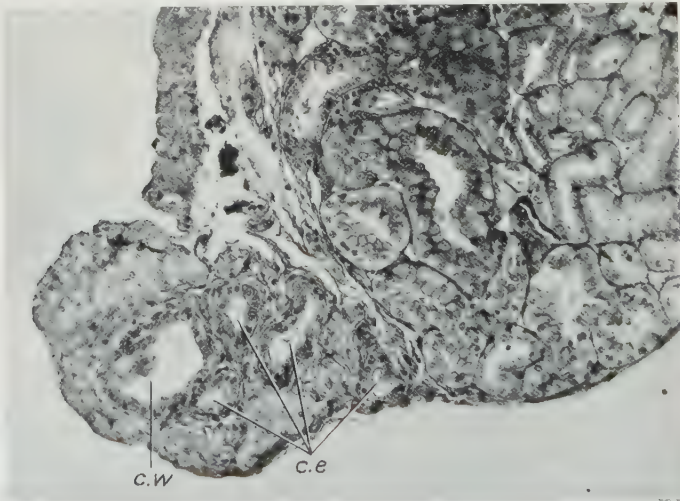


Fig. 4. Canaux excréteurs (*c.e.*) et canal de Wolff (*c.W.*) au printemps chez la femelle. En comparaison avec le mâle, on remarque l'épithélium cubique des canaux excréteurs et du canal de Wolff, dépourvus l'un et l'autre de matériel P.A.S. positif. SANFELICE; coloration allochromique de LILLIE. 80 ×

Le mince tube déférent provenant du testicule débouche dans le glomérule.

**b) Néphrostome et canal néphrostomial.** La communication entre les néphrons et la cavité coelomique est une condition assez fréquente chez le Triton; elle n'est complètement absente que dans le rein génital du mâle.

Les néphrostomes ont la forme d'un entonnoir béant limité par un épithélium à cellules sub-cubiques munies chacune d'un pinceau de cils longs et minces qui semblent se diriger vers le canal néphrostomial.

L'épithélium du néphrostome est en prolongement de celui du canal néphrostomial dont les cellules présentent les mêmes caractères, y compris le pinceau de cils orientés à l'intérieur de la cavité, vers le collet.

D'habitude le canal néphrostomial est assez long et sinueux et il débouche dans le collet. Ses caractères cytologiques sont similaires aux caractères de ce dernier, dont il diffère cependant à la suite de l'absence des granulations de matériel PAS positif au sommet de ses cellules (voir plus bas).

La recherche des activités enzymatiques est demeurée négative.

**c) Le collet (Fig. 6).** Il a une longueur variable, mais il est généralement assez long. D'habitude le collet des glomérules plus profonds est rectiligne, tandis qu'il est ondulé s'il part d'un glomérule superficiel pour se diriger vers le segment à bordure en brosse de la région latérale du rein.

A sa naissance, il a la forme d'un entonnoir plus ou moins béant; les cellules du feuillet pariétal de la capsule de BOWMAN qui étaient jusqu'ici laminaires deviennent brusquement sub-cubiques. Chacune d'elles porte à son extrémité un pinceau de long cils qui s'engagent dans la lumière du tube.

Nous avons pu observer l'influence considérable qui exerce la fixation sur l'aspect des cils. Dans les coupes de pièces fixées au liquide des CHAMPY, BOUIN ou HELLY, les cils semblent s'agglutiner en un plumet rigide, tandis que, après la fixation au SANFELICE, ils semblent confluer dans la lumière du tube où ils demeurent indépendants les uns des autres.

L'épithélium du collet appuie sur une basale P.A.S. positive qui est en prolongement de celle de la capsule de BOWMAN.

De forme cubique, les cellules ont un noyau volumineux et peu de cytoplasme. Une quantité considérable de granulations P.A.S., HALE et F.P. positives, mais bleu alcian négatives, est souvent présente à la région apicale des cellules. Les granulations ne sont pas métachromatiques.

Le chondriome est peu abondant; il est formé de petits mitochondres et il est distribué de façon apparemment uniforme dans le cytoplasme.

La seule activité enzymatique que nous ayons pu mettre en évidence est celle ATPasique, activité du reste extrêmement faible.

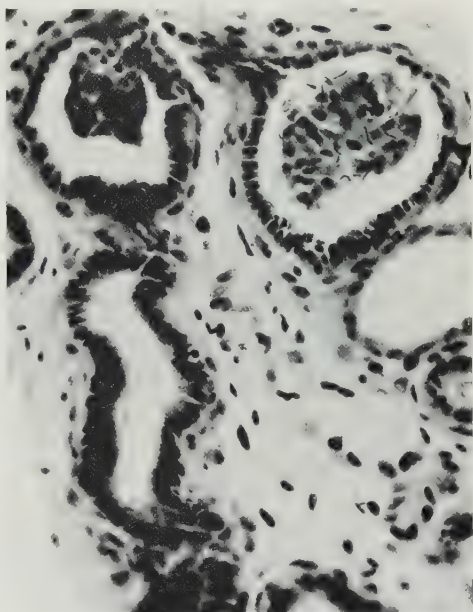


Fig. 5. Glomérules du rein génital chez le mâle. Remarquer le feuillet pariétal très épais de la capsule de BOWMAN, les spermatozoïdes dans la chambre glomérulaire (à droite) et l'abondant tissu conjonctif qui entoure les néphrons. SANFELICE; hématoxiline au fer. 160 ×



d) **Segment à bordure en brosse.** Le segment à bordure en brosse qui prolonge le collet a un diamètre de loin supérieur à celui de ce dernier. On observe en effet que la lumière du tube devient légèrement plus grande, mais surtout que les cellules,

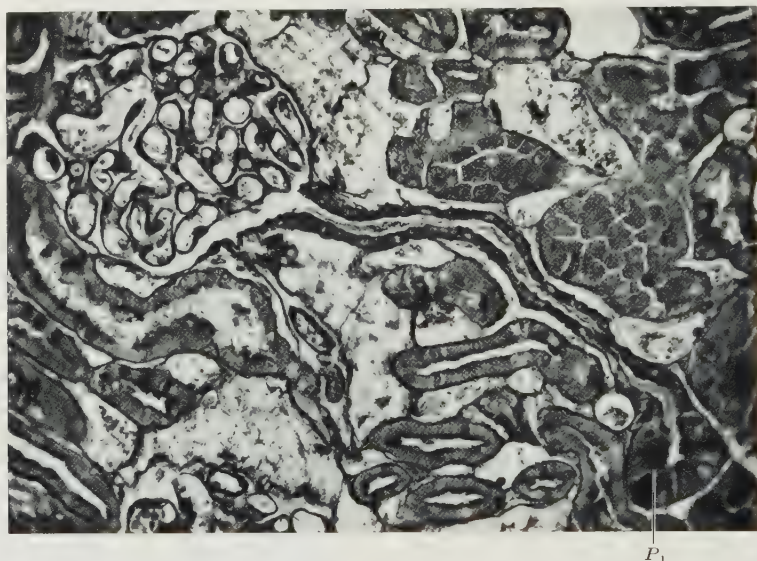


Fig. 6. Glomérule et collet cilié qui débouche dans le segment à bordure en brosse ( $P_1$ ). Remarquer la longueur du collet, son allure sinueuse et ses cellules P.A.S. positives. HELLY; coloration allochromique de LILLIE. 160  $\times$

auparavant cubiques, deviennent prismatiques; elles n'ont pas de cils, mais possèdent une bordure en brosse assez développée. Le sommet des cellules est en forme de coupole.

De nombreux auteurs, comme l'avons souligné dans l'introduction, ont constaté qu'il était possible de diviser le segment à bordure en brosse en deux tronçons, indiqués par  $P_1$  et  $P_2$ , aussi bien chez les Vertébrés inférieurs (EDWARDS 1933, *a*; GRAFFLIN, 1937; LONGLEY et FISHER, 1954; MAZZI, 1958; MAZZI et PEYROT, 1961), que chez les Mammifères (EDWARDS, 1933, *b*; FOOTE et GRAFFLIN, 1938 à 1942; LONGLEY et FISHER, 1954; MANGIONE, 1957).



Fig. 7. Chondriome dans les cellules du  $P_1$ . CHAMPY; méthode de ALTMANN-KULL. 800  $\times$

Une division de ce genre peut être appliquée aussi au néphron du Triton, où on peut distinguer en se

basant sur certains caractères cytologiques et histochimiques, deux tronçons du segment à bordure en brosse que nous indiquerons par  $P_1$  et  $P_2$  et que nous décrirons ci-dessous séparément.

*1<sup>er</sup> tronçon ( $P_1$ ).* C'est le tronçon le plus court du néphron; sa lumière n'est guère plus grande que celle du collet, mais son diamètre est constamment quatre fois plus grand que celui de ce dernier.

L'épithélium repose sur une basale P.A.S. positive qui se colore en bleu-vert par la méthode de RITTER et OLESON et qui ne se colore pas par le bleu alcian.

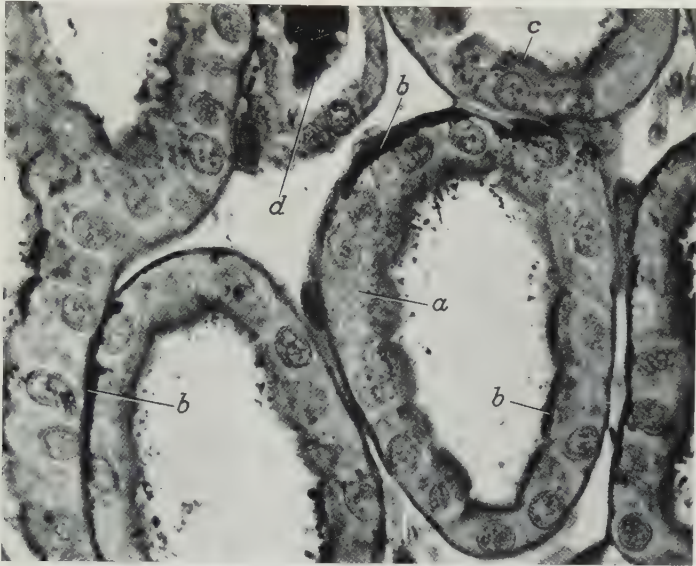


Fig. 8. Segment à bordure en brosse: P<sub>1</sub>. Le matériel P.A.S. positif est distribué sous forme de fines granulations dans la région située au-dessus du noyau (a), sous forme d'amas à la base et au sommet des cellules (b). En c. on peut remarquer la distribution caractéristique des substances P.A.S. positives au niveau de la bordure en brosse. d. segment d'union. SANFELICE; coloration allochromique de LILLIE. 360 ×

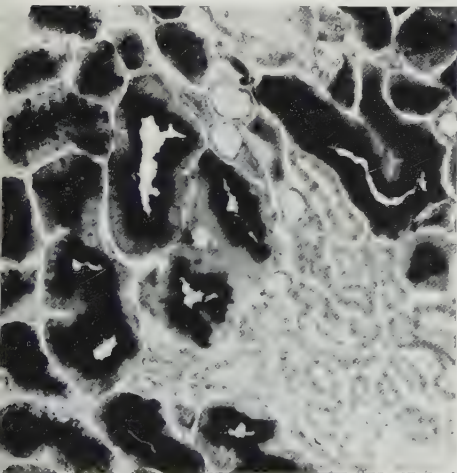


Fig. 9

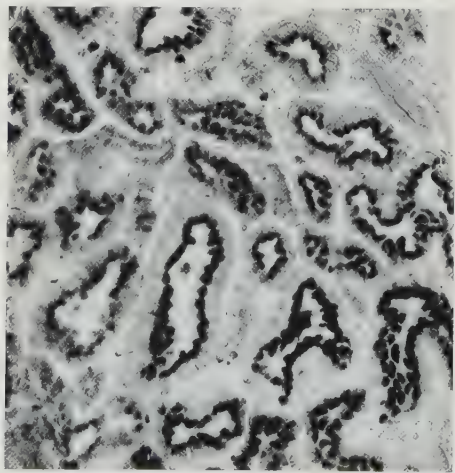


Fig. 10

Fig. 9. Phosphatase alcaline non spécifique dans le segment à bordure en brosse. Tous les autres segments du rein en sont dépourvus. La réaction, très intense, est étroitement localisée dans la région située au-dessus du noyau et dans la bordure en brosse. A gauche de la figure on remarque quelques sections du P<sub>2</sub>, où les granulations de pigment ont réagi positivement. Formol-calcium à 0—4° C.; inclusion à la gélatine; méthode de GOMORI-DANIELLI; incubation 30'. 80 ×

Fig. 10. Phosphatase acide non spécifique dans le segment à bordure en brosse. Remarquer la localisation de l'activité enzymatique qui est limitée à la région de l'appareil de GOLGI. Formol-calcium à 0—4° C.; inclusion à la gélatine; méthode de GOMORI; incubation 45'. 80 ×

La réaction P.A.S. positive de la basale est intense dans les coupes fixées aux liquides de BOUIN ou de SANFELICE; elle est au contraire très faible ou négative dans les coupes fixées au liquide de HELLY.

Le noyau n'est pas très volumineux; faiblement colorable il est situé dans le tiers basal de la cellule.

Le cytoplasme est généralement peu dense; on peut observer, bien que rarement, des cellules qui réagissent de façon plus intense au P.A.S. et qui, après la coloration de ALTMANN-KULL, semblent plus foncées. Parfois, mais très rarement, on observe des cellules ciliées.

Le chondriome, distribué dans toute la cellule est plus abondant dans la région basale; il est formé surtout de mitochondries granulaires, mais aussi de chondriochontes assez courts et ramassés (Fig. 7).

La distribution du matériel P.A.S. positif (Fig. 8) est extrêmement caractéristique: en plus de fines granulations dans la région située au-dessus du noyau on observe des amas de matériel intensément coloré souvent localisé à la base des cellules, ou quelques fois le long des limites cellulaires. Ces granulations se colorent par la réaction de HALE, mais non par le bleu alcian ou la F.P.

Au niveau de la bordure en brosse la réaction au P.A.S. permet de déceler deux régions très nettement positives, l'une située au sommet des microvillosités et l'autre à leur base. Entre les deux régions se trouve une troisième région qui ne réagit pas au P.A.S., mais qui est HALE positive.

La réaction P.A.S. positive située à la base de la bordure en brosse est localisée dans de fines granulations qui sont, elles aussi, HALE et F. P. positives.

L'un de nous (PEYROT, 1960) a déjà signalé que cette partie du tube à bordure en brosse est siège de l'activité de nombreux enzymes.

La phosphomonoestérase alcaline non spécifique est présente dans toute la région apicale des cellules et dans la bordure en brosse (Fig. 9).

On n'observe aucune différence appréciable ni dans des différents néphrons, ni dans les différentes parties d'un même néphrons, comme cela se produit par contre chez le Carpe (MAZZI, 1958) ou chez la Tanche (MAZZI et PEYROT, 1961).

La réaction enzymatique est déjà très nette après 10' d'incubation et si celle-ci se prolonge au-delà de 45', elle tend à se répandre dans toute la cellule.

Pour la recherche de l'activité phosphomonoestérasique alcaline, nous avons employé soit des pièces fixées au formol-calcium froid et incluses à la gélatine ou conservées dans une solution de saccharose et de gomme arabique selon les indications de HOLT, soit des pièces non fixées et débitées en coupes au criostate de PEARSE. Nous n'avons observé aucune différence appréciable ni en ce qui concerne l'intensité de la réaction, ni en ce qui concerne la localisation de l'activité enzymatique entre le matériel fixé et celui non fixé.

L'activité phosphomonoestérasique acide non spécifique est très nettement localisée dans la région située au-dessus du noyau qui correspond à la région de l'appareil de GOLGI.

La réaction est intense après 45' d'incubation (Fig. 10). Les conditions de travail que nous avons choisies nous ont permis d'éviter toute diffusion de l'enzyme: la bordure en brosse, le noyau et le reste du cytoplasme demeurent en effet absolument négatifs (Fig. 10 et 11).



La glucose 6-phosphatase est localisée dans tout le cytoplasme; le noyau et la bordure en brosse en sont par contre dépourvus (Fig. 12 et 13). La réaction apparaît après une incubation de 10' et devient intense après 20'—30'. Si on prolonge l'incubation au-delà de cette limite, on observe souvent la formation d'un dépôt noir de sels de Plomb, sels qui sont répandus sur toute la surface.

L'activité adénosino-triphosphatasique est très faible et limitée à la région basale de la cellule où le chondriome est plus abondant. Si la réaction est exécutée

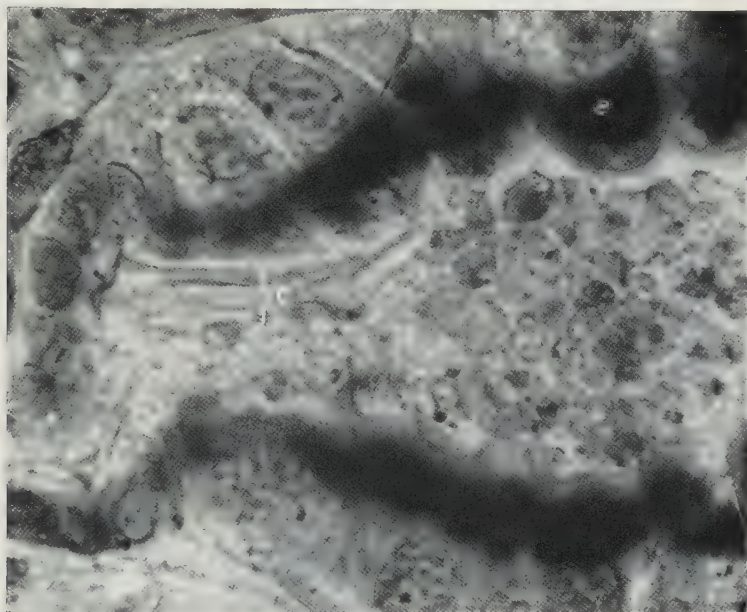


Fig. 11. Phosphatase acide non spécifique. Point de transition entre le collet et le segment à bordure en brosse. On reconnaît les cellules du collet dépourvues d'enzyme, grâce à leurs longs cils (*c*) qui pénètrent dans la lumière du segment suivant. La localisation de l'enzyme (*e*) est très précise. La lumière du segment à bordure en brosse est remplie de matériel d'excrétion ressemblant à des débris. Formol-calcium à 0—4° C.; inclusion à la gélatine; méthode de GOMORI; incubation 45'. 800 ×

sur de matériel fixé au formol-calcium, on observe en outre une intense réaction brunâtre de la basale, et une coloration plus faible de la bordure en brosse.

L'activité lipasique atteint le maximum d'intensité dans le  $P_1$ . L'enzyme est répandue dans tout le cytoplasme à l'exclusion du noyau (Fig. 14).

La succino-déshydrogénase présente dans la région basale des cellules, est très faible.

La recherche de l'activité 5-nucléotidasique nous a donné des résultats très différents selon le substrat que nous avons employé.

Avec la méthode au Ca de GOMORI, lorsqu'on emploie l'acide adénosine 5'-phosphorique du muscle, la réaction, après une incubation de 1 heure 30', est très faible: localisée dans les noyaux et dans les parois conjonctives des canaux excréteurs et des vaisseaux plus gros, elle révèle une certaine tendance à ce propager. Avec la méthode au Pb de WACHSTEIN et MEISEL lorsqu'on emploie le même substrat et que le temp d'incubation est le même, la réaction est localisée dans les mêmes structures, mais cette réaction est plus précise et son intensité est

plus grande. Si, dans la méthode au Pb, on emploie comme substrat l'acide adénosine 3-phosphorique la réaction apparaît dans les glomérules, dans le cytoplasme située au-dessus du noyau des cellules du segment à bordure en brosse et dans les parois des vaisseaux.

*II<sup>e</sup> tronçon (P<sub>2</sub>)* (Fig. 15). Le passage de P<sub>1</sub> à P<sub>2</sub> a lieu progressivement et le tronçon P<sub>2</sub> qui est le plus étendu du néphron a généralement un calibre variable.

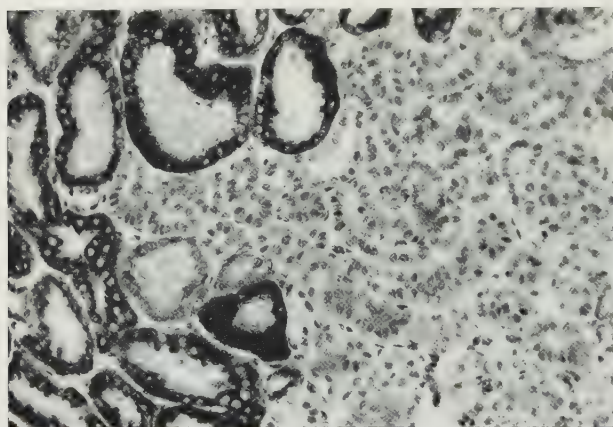


Fig. 12. Glucose 6-phosphatase. Distribution de l'enzyme au niveau du segment à bordure en brosse; les autres segments du néphron sont dépourvus de toute activité enzymatique. Matériel non fixé et débité au criostat de PEARSE; méthode de CHIQUOINE — hemalum; incubation 30'. 80 ×

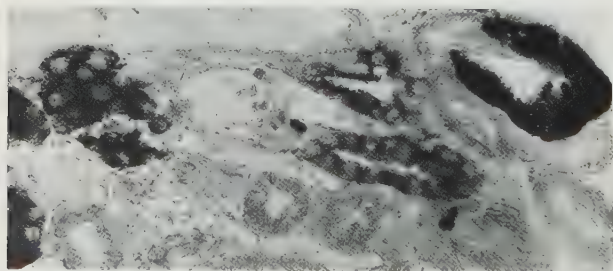


Fig. 13. Glucose 6-phosphatase. Point de passage du collet cilié, lequel est dépourvu d'enzyme, au tube à bordure en brosse. Coupe non fixée et débitée au criostat de PEARSE; méthode de CHIQUOINE; incubation 30'. 160 ×

La bordure en brosse, qui est développée sur toute l'extension du tronçon, a les mêmes caractéristiques fondamentales que P<sub>1</sub>.

Dans P<sub>2</sub> on observe assez souvent des modifications de la région apicale des cellules qui pourraient être considérées en tant que liées à des phénomènes de sécrétion ou d'absorption.

Les cellules sont généralement prismatiques, hautes, et leur sommet est en forme de coupole.

Le noyau est situé dans le tiers basal de la cellule; il est assez grand mais pauvre en chromatine.

Une caractéristique constante de ce tronçon du néphron est fournie par la présence d'un pigment jaune-brun, plus ou moins abondant,

alcool-soluble, F.P. positif et quelquefois faiblement P.A.S. positif. Il est situé à la région basale ou entoure le noyau de la cellule; ce pigment a la forme de gouttelettes, lesquelles ont parfois des dimensions considérables.

Vers la partie distale du P<sub>2</sub>, le pigment diminue et il est pratiquement absent au niveau du passage de P<sub>2</sub> dans le segment intermédiaire.

Les cellules du P<sub>2</sub> sont très nettement P.A.S. positives (Fig. 15); cette réaction est due à deux sortes de granulations: les unes très fines sont massées à la région situées au-dessus du noyau, mais sous la bordure en brosse; les autres plus grandes sont généralement mêlées au gouttelettes de pigment, sur lesquelles elles se détachent grâce à la couleur rouge vif qu'elles prennent. Ces deux types de

granulations sont également HALE et F. P. positives, mais elles ne se colorent pas par le bleu alcian.

La réaction au P.A.S. met en évidence aussi nettement que dans le  $P_1$ , les deux régions, positives de la bordure en brosse, régions qui sont séparées par une bande P.A.S. négative.

Les chondriosomes, sous forme de grains ou de courts bâtonnets, sont répandus dans toute la cellule.

La méthode de BRACHET permet de déceler la présence d'une faible quantité de ARN cytoplasmique.

De même que  $P_1$ ,  $P_2$  est la partie du néphron où on peut déceler histochimiquement le plus grand nombre d'activités enzymatiques.

Les phosphomonoestérases non spécifiques, qu'il s'agisse de celle alcaline ou de celle acide, ont la même localisation que celle observée en  $P_1$ .

L'activité glucose 6-phosphatasique, bien que présentant la même localisation (tout le cytoplasme, à l'exclusion de la bordure en brosse et du noyau), semble cependant plus faible qu'en  $P_1$ ; comme dans ce dernier, l'activité ATPasique qui est très faible, est limitée à la région basale de la cellule.

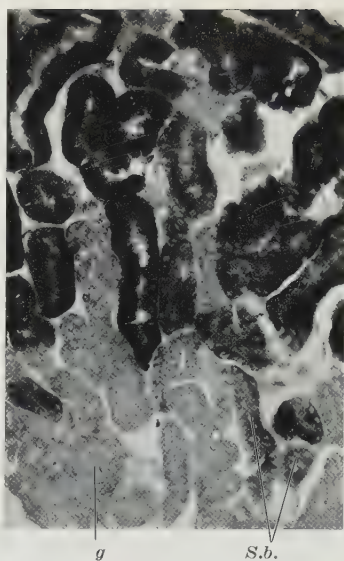


Fig. 14. Lipase. L'activité enzymatique atteint son maximum d'intensité dans le segment à bordure en brosse; elle est faible dans certaines régions du segment à bâtonnets (*S.b.*); les glomérules (*g*) semblent dépourvus d'enzyme Formol — calcium à 0—4°C.; méthode de NACLAS et SELIGMAN, 80 ×



Fig. 15. Segment à bordure en brosse ( $P_2$ ). On peut observer les modifications apicales des cellules et la distribution des grosses gouttes de pigment (*p.*) ainsi que celle du matériel P.A.S. positif, lequel est formé de granulations très fines situées au-dessus du noyau (*b*) et de granulations plus grandes mêlées au pigment. En *d* le sommet de quelques cellules semble moins modifié et l'on y observe la distribution caractéristique des substances P.A.S. positives. SANFELICE; coloration allochromique de



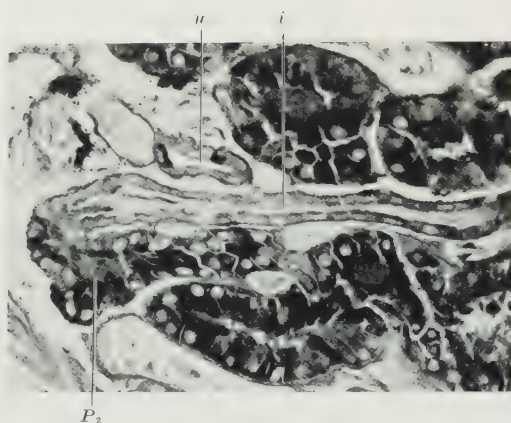


Fig. 16. Point de passage du  $P_2$  au segment intermédiaire (*i*). La réaction P.A.S. positive des cellules du segment intermédiaire est très faible; celle des cellules du  $P_2$  est irrégulière. En *u* une section du segment d'union avec deux cellules intensément P.A.S. positives. HELLY; coloration allochromique de LILLIE. 160  $\times$

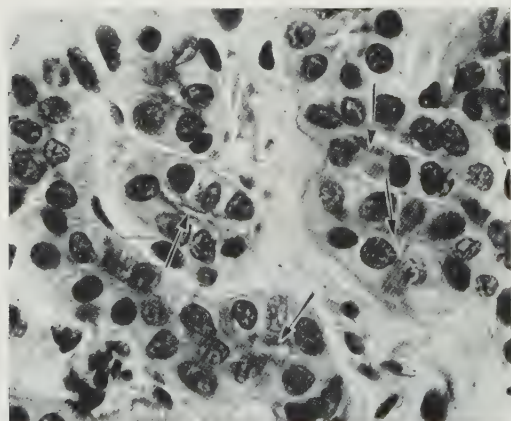


Fig. 17. Matériel bleu alcian positif (flèches) au sommet des cellules du segment à bâtonnets. HELLY; bleu alcian selon STEEDMANN - hémalum. 360  $\times$

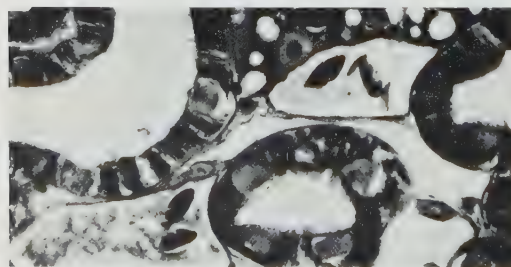


Fig. 18. Disposition du chondriome dans les cellules du segment à bâtonnets. CHAMPY; méthode de ALTMANN-KULL. 360  $\times$

L'activité lipasique, est encore très accentuée, mais peut-être moins qu'en  $P_1$ ; nous devons cependant souligner à ce propos qu'il est possible d'observer des variations considérables entre les différents néphrons.

La succino-déshydrogénase et la 5-nucléotidase ont les mêmes caractéristiques de distribution et d'intensité de réaction que celles observées en  $P_1$ .

Le segment à bordure en brosse du rein génital mérite qu'on lui consacre quelques mots. Chez la femelle les néphrons de cette région ne diffèrent guère, quant à leurs caractères généraux, de ceux du rein lombaire; chez le mâle, ce segment, notamment en ce qui concerne les néphrons antérieurs, est limité par un épithélium prismatique formé de cellules très hautes et ciliées. Ces cellules présentent, toutefois, certains caractères typiques de segment à bordure en brosse, c'est-à-dire, la disposition régulière du chondriome et le pigment jaune-brun.

#### e) Le segment intermédiaire.

Le passage de  $P_2$  au segment intermédiaire (Fig. 16) est marqué par une brusque diminution du diamètre du tube et de sa lumière; les cellules qui deviennent tout à coup aplaties et sub-cubiques, sont munies d'un pinceau de cils qui s'unissent en panache en s'engageant dans la lumière du tube où elles sont dirigées vers le segment suivant.

La longueur du segment intermédiaire qui n'est jamais très grande, est généralement

inférieure à celle du collet; son calibre est constant. Après un parcours plus ou moins sinueux, le segment intermédiaire dont la lumière et le diamètre augmentent tout à coup de dimensions, passe dans le segment à bâtonnets.

Les cellules sont pauvres en cytoplasme et présentent une faible réaction P.A.S. positive: ce caractère permet de distinguer assez aisément ce segment du collet.

Le chondriome est formé par des petits chondriocoates. L'épithélium repose sur une basale très mince, P.A.S., HALE et F.P. positive.

Les seules activités enzymatiques que nous avons pu déceler dans le segment sont une faible activité ATPasique et une activité lipasique tout aussi faible. Cette dernière est de plus très variable suivant les néphrons.

f) **Segment à bâtonnets.** Logé en position plus ou moins superficielle, dans la région ventrale du rein, le segment à bâtonnets est plus court que celui à bordure en brosse. De diamètre inférieur et assez uniforme, il présente en outre une ample lumière.

Les cellules sont grandes, cubiques et claires. On rencontre parfois des cellules qui, dans les préparations, sont plus colorables et semblent par conséquent plus foncées. Ces dernières présentent une faible réaction P.A.S. positive et une certaine quantité de matériel situé à la région apicale qui se colore par le bleu alcian (Fig. 17).

Au niveau des limites cellulaires on observe notamment des amas, parfois assez grands, de matériel P.A.S. positif: leur position pourrait être ramenée à des phénomènes de passage à travers les cellules.

Le chondriome qui est formé de nombreux mitochondries orientés selon l'axe le plus grand de la cellule, présente une typique disposition à bâtonnets étroitement entassés (Fig. 18).

L'aspect de la surface libre des cellules est extrêmement intéressant: parfois il fait penser à des phénomènes de sécrétion, parfois on ne saurait exclure la présence d'une cuticule ou même d'une bordure en brosse rudimentaire.

Les images, de sécrétion apparente sont liées à la présence de matériel P.A.S. et bleu alcian positif (Fig. 17) au sommet des cellules, matériel qui semble se déverser dans la lumière du tube.

Dans les conditions techniques que nous avons adoptées nous n'avons pas réussi à démontrer la présence d'activité phosphatasique alcaline ni de celle glucoso 6-phosphatasique.

L'activité phosphatasique acide est au contraire très facile à démontrer; elle est localisée dans la zone située au-dessus du noyau correspondant à la région de l'appareil de GOLGI. Plus faible que dans le segment à bordure en brosse, elle semble diminuer progressivement en direction caudale.

L'activité ATPasique atteint son maximum d'intensité dans ce segment (Fig. 19).

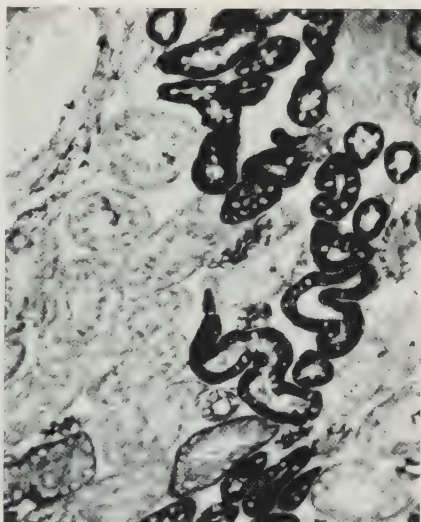


Fig. 19. Activité ATPasique. La réaction atteint son maximum d'intensité dans le segment à bâtonnets: elle est très faible dans les autres segments du néphron. Matériel non fixé; coupe au criostate de PEARSE; méthode de WACHSTEIN et MEISEL; incubation 30'. 80 ×

A la suite d'une incubation de 15' l'enzyme est très nettement localisé au niveau du chondriome, mais si ce temps est prolongé à 25', on observe déjà un noircissement répandu sur tout le cytoplasme.

Au niveau du chondriome on peut déceler de même une intense activité succino-déshydrogénasique (Fig. 20 et 21).

L'activité lipasique, répandue dans toute la cellule à l'exclusion du noyau, peut être démontrée dans le tiers distal du segment (Fig. 14).

g) Segment d'union et tubes collecteurs. Le passage du segment à bâtonnets au segment d'union a lieu progressivement. Ce dernier a généralement une

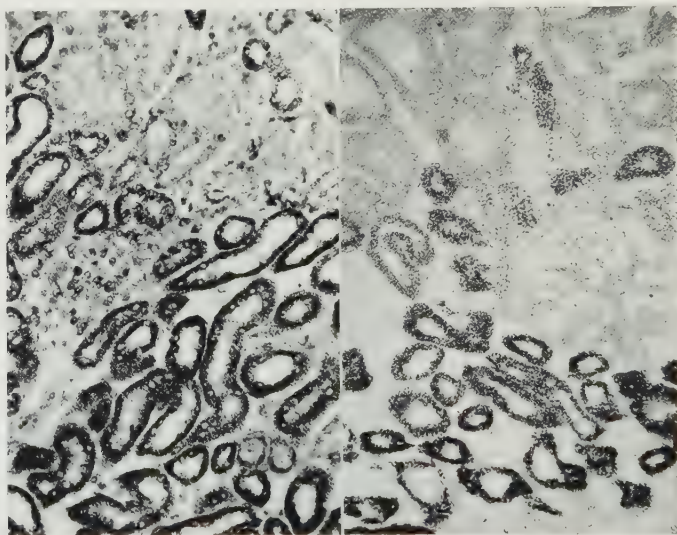


Fig. 20

Fig. 21

Fig. 20. Activité succino-déshydrogénasique. La réaction atteint son maximum d'intensité au niveau du segment à bâtonnets. Matériel non fixé; coupe au criostate de PEARSE; méthode de SHELTON et SNAIDER et coloration nucléaire par l'hémalum; incubation 45'. 80 x

Fig. 21. Activité succino-déshydrogénasique. Pas de coloration nucléaire. Autres conditions identiques à celles de la figure 20

lumière fort réduite. Son épithélium à cellules assez basses repose sur une basale P.A.S. positive qui prolonge celle du segment précédent. Les cellules ont un gros noyau et très peu de cytoplasme: ce cytoplasme est faiblement colorable.

On observe parfois des cellules à cytoplasme intensément P.A.S. positif. Le chondriome est formé de chondriocotes.

Les segments d'union des différents néphrons se réunissent pour former des tubes collecteurs d'un plus gros calibre qui cheminent le long du bord dorso-latéral du rein; ils en sortent à différents niveaux et se dirigent — directement chez la femelle, ou après un parcours plus long et de façon plus caudale chez le mâle — vers le canal de WOLFF.

Ces canaux collecteurs, même lorsqu'ils cheminent encore le long du bord dorsal du rein, présentent des différences considérables.

Chez la femelle ils gardent une structure et un aspect assez semblables à ceux du segment d'union, mais ils ont une enveloppe conjonctive plus épaisse et un diamètre plus grand, ce qui est dû à la lumière du tube qui est plus large (Fig. 4).



Chez le mâle les cellules de l'épithélium des collecteurs se transforment, au contraire, en éléments longs et étroits (Fig. 3) lesquels sont remplis de granulations acidophiles, P.A.S., P.F. et HALE positives et nettement pyroninophiles. La lumière du collecteur devient plus étroite mais, vu la hauteur de l'épithélium, son diamètre augmente. L'enveloppe conjonctive est très épaisse.

En même temps que les collecteurs s'unissent pour former des tubes plus gros, leur granulations intra-cellulaires deviennent de moins en moins abondantes. Elles sont enfin limitées à quelques cellules, et le tube présente, alors, les caractères du canal de WOLFF.

Dans ce segment nous n'avons pu démontrer que l'activité 5-nucléotidasique : lorsque la méthode est celle de WACHSTEIN et MEISEL, et que le substrat employé est l'acide adénosine 5'-phosphorique cette activité semble intense au niveau des noyaux mais elle l'est un peu moins au niveau de l'enveloppe conjonctive; si le substrat employé est l'acide adénosine 3-phosphorique, l'activité enzymatique est, au contraire, localisée dans la région située au-dessus des noyaux mais elle semble très faible dans les noyaux.

### Discussion des résultats

Malgré le nombre et l'ampleur des recherches effectuées sur le rein des Amphibiens, ces recherches n'avaient fait l'objet d'aucun examen cytologique et histo-chimique complet en ce qui concerne le Triton et les Urodèles en général.

L'application de plusieurs techniques modernes nous a permis de recueillir des données, dont certaines nous semblent dignes d'être soulignées et discutées.

Nous pouvons remarquer avant tout que, dans le rein du Triton, les néphrons sont disposés de façon régulière et que leur structure histologique correspond généralement à la description que nous en ont laissé à propos des Urodèles, les auteurs qui nous ont précédé (LAMBERT, 1934 chez *Salamandra maculosa*; CHASE, 1938, chez *Necturus rafinesque*).

Le diamètre du tube est inégal: il atteint son minimum dans le collet, dans le segment intermédiaire et dans le segment d'union; le segment à bordure en brosse est certainement celui qui est le plus long et le plus gros.

Le collet est souvent assez long; sa variation de longueur peut être ramenée à la position plus ou moins superficielle du glomérule dont il tire son origine.

Les néphrostomes sont nombreux sur toute la longueur du rein; ils sont souvent groupés.

Des néphrostomes part un canal néphrostomial qui a généralement une longueur considérable et une allure ondulée, et qui débouche dans le collet. Dans le rein génital du mâle, les néphrostomes font défaut; ils sont au contraire présents chez la femelle.

De nombreux auteurs ont signalé la présence de cils dans les cellules du collet des Amphibiens (POLICARD, CORDIER, GERARD et CORDIER, LAMBERT, CHASE), mais personne, pensons-nous, n'avait encore décrit jusqu'ici chez d'autres Amphibiens, les caractéristiques granulations situées dans la région apicale de la cellule. Ces granulations qui font défaut dans le canal néphrostomial et dans le segment intermédiaire — ciliés eux aussi — sont P.A.S., HALE et F.P. positives, elles ne sont par métachromatiques et ne se colorent pas par le bleu alcian: elles ne devraient donc pas être formées de mucopolysaccharides acides. Des granulations

ayant la même position, mais nettement métachromatiques ont été observés, dans le rein de la Carpe, par MAZZI (1958) et, dans le rein de la Tanche, par MAZZI et PEYROT (1961); chez cette dernière espèce elles se colorent par le bleu alcian.

En ce qui concerne le segment à bordure en brosse, si l'on ne considère que la réaction au P.A.S. au niveau de la bordure et la distribution de la phosphatase alcaline on n'observe guère chez le Triton, pas plus que chez *Rana pipiens* (LONGLEY et FISHER 1954), de différences considérables le long de son parcours. Si l'on observe au contraire la position du pigment et des substances P.A.S. positives endo-cellulaires il semble évident que le segment à bordure en brosse puisse être divisé chez le Triton aussi, en deux tronçons que nous avons indiqué, comme on a désormais l'habitude de le faire, par  $P_1$  et  $P_2$ .

Dans  $P_1$ , le matériel P.A.S. positif est formé de fines granulations, dont la plupart sont disposées entre le noyau et le sommet de la cellule, et par des amas irréguliers disposés à la base de la cellule ou le long des limites cellulaires; dans  $P_2$ , le matériel P.A.S. positif est formé, au contraire, de granulations plus grandes, distribuées de façon irrégulière, le plus souvent autour du noyau, et mêlées aux gouttes de pigment jaune-brun. Ces granulations résistent à l'action de la diastase salivare et ne se colorent pas par le bleu alcian; elles ne sont pas métachromatiques par le bleu de Toluidine aux  $pH$  compris entre 3,5 et 8; elles ne semblent pas contenir de groupement —SS— et enfin ne sont pas pyroninophiles.

Les fines granulations qui sont localisées au-dessus du noyau dans  $P_1$  sont elles aussi HALE et F.P. positives; les granulations du  $P_2$  ont les mêmes caractéristiques; elles sont en outre fortement acidophiles. Bien que la nature de ces granulations P.A.S. positives n'est pas très claire, nous pouvons cependant affirmer qu'elles ne sont pas formées de glycogène, et qu'elles ne semblent pas en contenir.

Il n'est guère facile d'établir au moyen du microscope optique s'il s'agit de phénomènes de résorption ou d'excrétion (on observe en effet une quantité abondante de matériel P.A.S. positif dans la lumière du tube). Depuis la première démonstration qu'en a donné OLIVER (1948), des phénomènes d'absorption ont été, comme on le sait, signalés à plusieurs reprises non seulement chez les Mammifères mais aussi chez les Poissons (JAFEE, 1956—1958), qu'il s'agisse de substances protéiques ou d'hydrates de carbone. La nature protéique des inclusions que le microscope permet de déceler dans les cellules du segment à bordure en brosse, a été démontrée aussi bien biochimiquement (STRAUS, 1954; KRETCHMER et DICKERMAN, 1954) qu'histochemiquement (LEE, 1954). De très récentes recherches effectuées au moyen du microscope électronique, ont permis de démontrer ultérieurement, que des protéines étrangères, injectées expérimentalement peuvent passer avec facilité à travers le filtre glomérulaire. Elle sont en suite, resorbées par les cellules du segment à bordure en brosse, au cours de phénomènes de pinocytose ou d'ultra-pinocytose et sont enfin isolées sous forme de granulations de dimensions variables; ces granulations ont été indiquées de façon différente par les auteurs qui les ont observées: liposomes, «microbodies», corps denses (Voir en particulier les recherches de STRAUS, 1959, et de FARQUAR et PALADE, 1960).

Des phénomènes d'excrétion (ou de sécrétion) ont été signalés et discutés à plusieurs reprises par de nombreux auteurs (BERTELLI, 1927—1929; LASCANO GONZALES, 1932; BARGMANN, 1934; MANGIONE, 1957) aussi bien chez les Mammifères que chez les Vertébrés inférieurs.

A la suite d'observations au microscope électronique, BARGMANN et ses collaborateurs (1955) ont confirmé récemment la présence de cellules douées d'activité sécrétoire (*Flaschenzellen*) dans la portion proximale du tube contourné du rein de *Xenopus*. Ces cellules avaient été décrites dès 1934 par BARGMANN. Leur sécrétat semble pouvoir être ramené à un mucopolysaccharide.

Dans  $P_2$ , comme nous l'avons signalé plus haut, nous avons observé aussi des gouttes de dimensions parfois considérables, d'un pigment jaune-brun. Elles correspondent, à notre avis, à celles décrites à plusieurs reprises chez les Anoures par POLICARD (1907—1910) et chez les Urodèles par LAMBERT (1929) par GERARD et CORDIER (1934) et par GERARD (1936—1954), gouttes qui ont été analysées histochimiquement chez la Salamandre par ZORZOLI et RAVIOLA (1955).

Des formations semblables ont été étudiées chez la Carpe par MAZZI (1958) et chez le Brochet par ZORZOLI et SBERNINI (1955).

Il s'agirait d'après nos observations d'une substance soluble en alcool et en chloroforme, laquelle est faiblement F. P. positive, et se colore faiblement en brun-noir après la réaction de la phosphatase alcaline.

Il est probable que ce pigment n'est guère différent de celui qui a été analysé par ZORZOLI et RAVIOLA (1955) dans le segment à bordure en brosse de *Salamandra maculosa*, et que ces auteurs ont pensé de pouvoir ramener par déduction à un chromolipoïde de type peu connu, peut-être très oxydé, et probablement mêlé à des substances protéiques.

Dans la bordure en brosse du tube contourné nous avons observé chez le Triton, une stratification caractéristique des substances P.A.S. positives, stratification qui ressemble fort à celle décrite chez la Carpe (MAZZI, 1958) et la Tanche (MAZZI et PEYROT, 1961). La région apicale des micro-vilosités de la bordure est P.A.S. positive, tandis que leur base est P.A.S. négative. On observe au-dessous de la bordure une certaine quantité de matériel P.A.S. positif qui forme généralement une bande étroite; celle-ci peut cependant être quelque fois assez large. Le chondriome de ce segment est formé de chondriosomes courts et ramassés, et parfois même de mitochondries granulaires. Sa distribution, qui correspond à celle signalée à plusieurs reprises chez d'autres Amphibiens (POLICARD 1910; GERARD et CORDIER, 1937; GERARD, 1936; LAMBERT, 1929) et chez le Triton crêté lui-même (JASSWOIN, 1925), ne semble pas varier de façon appréciable le long du segment.

Le segment intermédiaire, cilié, prolonge le  $P_2$  après un brusque rétrécissement du tube; sa caractéristique la plus typique est l'absence de substances P.A.S. positives dans ses cellules. Au niveau du passage entre les deux segments, les cellules ciliées paraissent tout à coup et les activités enzymatiques qui caractérisent  $P_2$  disparaissent tout aussi brusquement; la seule trace qui en reste est une faible activité ATPasique.

La caractéristique la plus saillante du segment à bâtonnets est l'abondance du chondriome orienté et bacillaire.

On observe fréquemment des images de sécrétion vésiculaire apparente au niveau du pôle apical de quelques cellules qui semblent déverser du matériel P.A.S. et bleu alcian positif dans la lumière du segment. De l'autre matériel P.A.S. positif, mais bleu alcian négatif, est présent en abondance sous forme de granulations ou d'amas irréguliers et prouve clairement qu'il participe à des phénomènes de passage à travers les limites cellulaires. Ces images correspondent



à celles récemment décrites chez la Tanche par MAZZI et PEYROT, (1961). On ne saurait exclure la présence d'une bordure rappelant celle qui a été mise en évidence chez les Mammifères par PEASE (1955) et par RHODIN (1958), au moyen du microscope électronique.

L'étude de la distribution des activités enzymatiques et leurs réactions à l'égard des conditions techniques adoptées exige quelques mots.

Dans nos recherches nous avons complété l'étude histochimique effectuée par PEYROT (1960) chez le Triton; cet auteur a étendu la première fois à un certain nombre d'activités enzymatiques les observations jusqu'alors limitées à la démonstration des activités phosphatasiques aussi bien alcaline qu'acide non spécifique. ARVY (1957) a été le seul à chercher dans le rein du TRITON l'activité lipasique, sans toutefois réussir à en démontrer histochimiquement la présence.

Il nous semble intéressant de souligner la correspondance fondamentale de la distribution des systèmes enzymatiques chez les Vertébrés des différentes classes<sup>1</sup>.

En ce qui concerne la distribution de la phosphatase alcaline non spécifique nos observations vont d'accord avec celles que LONGLEY et FISHER (1954) et GLENNER et BURSTONE (1958) ont conduites sur d'autres Amphibiens. Chez le Triton ARVY et GABE (1953) ont observé au niveau des glomérules une activité enzymatique qui est absente dans nos préparations. Nous pensons que ce fait peut être ramené aussi bien à la différence de fixation (formol-calcium à 4° C. au lieu de l'Acétone), qu'au temps d'incubation plus long (2 à 12 heures) employé par les auteurs français.

La phosphatase acide non spécifique qui est présente dans tous les segment du néphron, est localisée au niveau de la région de l'appareil de GOLGI, située au-dessus du noyau. Une disposition identique a été observée chez d'autres Vertébrés inférieurs (MAZZI et PEYROT, 1961, chez la Tanche).

L'activité lipasique, que ARVY n'avait pas réussi à déceler histochimiquement, est assez abondante dans tout le segment à bordure en brosse, ainsi qu'il ressort des observations de PEYROT (1960). Nous avons pu observer une localisation exactement semblable chez *Salamandra maculosa*<sup>2</sup>.

Le contraste entre nos observations et celles de ARVY nous semble dû aux différentes techniques employées. Les Tweens (40 et 60) que ARVY emploie selon la méthode de GOMORI, sont hydrolysés avec beaucoup de difficultés par la lipase rénale du Triton. L'activité enzymatique peut être en effet, décelée par la méthode de GOMORI exclusivement au moyen d'une incubation prolongée (de 14 à 16 heures) et si on a augmenté expérimentalement l'activité enzymatique (FERRERI et PEYROT, 1961).

<sup>1</sup> On peut comparer à ce propos entre autres recherches celles effectuées sur le rein des Poissons par ARVY (1954), par LONGLEY et FISHER (1954), par MAZZI (1958), par GABE (1957—1959), par MAZZI et PEYROT (1961); celles sur le rein des Amphibiens par DELSOL (1953), par ARVY et GABE (1953), par ARVY (1957), par GLENNER et BURSTONE (1958), par PEYROT (1960); celles sur le rein des Reptiles par GABE (1959) et celles sur le rein des Mammifères par CHIQUOINE (1953—1955), par WACHSTEIN (1946—1955) et par MANGIONE (1957).

<sup>2</sup> Lors de nos recherches sur les enzymes du rein du Triton nous avons pu disposer de quelques exemplaires de *Salamandra maculosa* chez lesquels nous avons recherché la lipase, la ATPase, et la phosphatase alcaline non spécifique. Nous avons trouvé ainsi qu'il existait une correspondance très étroite entre la distribution des enzymes chez cet Urodèle et celle observée chez le Triton.

La façon différente dont se comporte l'enzyme rénal du Triton envers les esters d'acides gras à longue chaîne ou à chaîne courte (FERRERI, 1960), nous invite à penser qu'on peut le considérer en tant qu'une *simple estérase* selon DEANE, BARNETT et SELIGMAN (1960)<sup>1</sup>. Il faut cependant tenir compte à ce propos du fait que chez le Triton, l'enzyme, est inhibé par le quinine chlorhydrate (FERRERI, 1960).

La glucose 6-phosphatase est exclusivement présente dans le segment à bordure en brosse; elle est localisée de la même façon que chez les Mammifères (CHICQUOINE, 1953—1955; WACHSTEIN, 1955). Vu qu'il s'agit d'un enzyme typiquement microsomial (DE DEUVE et BERTET, 1954), lequel est localisé dans les membranes du réseau endoplasmique (SIECHEVITZ, 1959), sa présence dans le segment à bordure en brosse du Triton nous permet de supposer que, chez cette espèce, il existe également les membranes du réseau endoplasmique qu'on n'avait observées jusqu'ici que chez les Mammifères (Cf. à ce propos RHODIN, 1958) et chez les Reptiles (ANDERSON, 1960).

Le caractère spécifique de l'enzyme<sup>2</sup> que nous avons décelé par la méthode de CHICQUOINE, est mis en doute par PEARSE (1960); en se basant aussi sur les considérations de DEANE, BARNETT et SELIGMAN (1960), nous pensons qu'il s'agit effectivement dans notre cas de la glucose 6-phosphatase et non d'une phosphatase non spécifique qui agit à un  $pH$  assez bas. Différentes conditions techniques choisies en tant que contrôle nous ont prouvé en effet que:

1. Sur du matériel non fixé, si le substrat spécifique est remplacé par du  $\beta$ -glycérophosphate et si on garde le même  $pH$  (6,7) on observe après 30' d'incubation<sup>3</sup> une réaction extrêmement faible et localisée de façon différente, c'est-à-dire au niveau de la bordure en brosse et dans la région située au-dessus du noyau. Bien que beaucoup plus faible cette réaction est superposable aux images que l'on obtient sur du matériel non fixé lorsqu'on recherche histochimiquement la phosphatase alcaline non spécifique.

2. Sur du matériel fixé au formol-calcium, la réaction, après 30' d'incubation, est négative; ceci est vrai aussi bien si l'on emploie le substrat spécifique que si l'on emploie le  $\beta$ -glycérophosphate en gardant le même  $pH$ <sup>4</sup>.

La réaction de l'ATPase se prête à quelque commentaire.

Chez le Triton — de même que chez la Salamandre — l'activité enzymatique est localisée au niveau du chondriome, bien qu'on ne puisse nier la présence d'une faible activité dans les basales. Seuls les noyaux sont toujours dépourvus d'activité ATPasique.

<sup>1</sup> «... We will consider simple esterases as enzymes that have a predilection for short-chain fatty acid esters of simple alcohols and phenols. These enzymes are inhibited by sodium taurocholate, fluoride and arsenilate, but not by quinine. ... Simple esterases occur in most tissues of the body and are exemplified by the liver enzyme.»

<sup>2</sup> On trouvera aussi quelques considération sur le caractère spécifique de la glucose 6-phosphatase dans le néphron de la Tanche, chez MAZZI et PEYROT (1961).

<sup>3</sup> C'est-à-dire le temps d'incubation que nous avons considéré optimal pour notre matériel lorsqu'il s'agissait du substrat spécifique.

<sup>4</sup> Ces résultats inviteraient à admettre l'existence d'une glycérophosphatase non spécifique qui agit à un  $pH$  légèrement acide (6,7); cette glycérophosphatase aurait la même localisation que la phosphatase alcaline non spécifique, et elle serait inhibée ou au moins fortement diminuée par la fixation, au point de ne plus pouvoir être décelée après une 30 minutes d'incubation.

La réaction atteint son maximum d'intensité dans le segment à bâtonnets (Fig. 19); de plus elle peut être décelée dans le segment intermédiaire, dans le segment à bordure en brosse — limitée à la région située au-dessous du noyau — et au niveau des cellules de la capsule glomérulaire où elle est très faible.

La fixation au formol à 4° C. ne semble guère influencer l'intensité de la réaction histochimique; la fixation au formol-calcium à 4° C. exerce au contraire une action très sensible et la réaction est moins intense. L'enzyme garde cependant la localisation au niveau du chondriome (Fig. 22 et 23); la réaction dans les basales s'accroît et une faible réaction apparaît dans la région située au-dessus du noyau du segment à bordure en brosse.

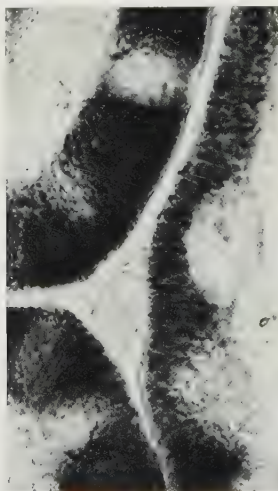


Fig. 22

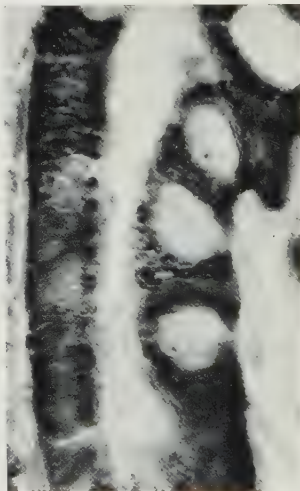


Fig. 23

Fig. 22. Activité ATPasique au niveau du chondriome du segment à bâtonnets. Matériel non fixé; coupe au criostate de PEARSE; méthode de WACHSTEIN et MEISEL; incubation 15'. 800 ×

Fig. 23. Activité ATPasique au niveau du chondriome du segment à bâtonnets. Matériel fixé au formol-calcium à 0—4° C.; méthode de WACHSTEIN et MEISEL; incubation 20'. Si on la compare à celle de la figure 21, l'activité enzymatique semble légèrement réduite bien que l'incubation soit prolongée à 20'. Son intensité est néanmoins considérable et sa localisation est très précise. 800 ×

Ces observations ne correspondent pas à ce que nous avons observé récemment dans notre Laboratoire à propos du rein de la Tanche (MAZZI et PEYROT, 1961). Chez ce poisson la fixation au formol-calcium inhibe complètement la réaction mitochondriale de l'ATPase et provoque l'apparition d'une réaction atypique dans les basales ainsi qu'au niveau des substances P.A.S. positives.

Signalons toutefois que des différences, quant'à l'action de l'ATPase, ont été récemment observées par NOVIKOFF (1958) et par NOVIKOFF et ses collaborateurs (1958) dans le rein du Rat. D'après ces auteurs la fixation au formol-calcium réduit de 85 à 90 p. 100 l'activité ATPasique dans les mitochondries des cellules hépatiques, tandis qu'elle agit d'une façon beaucoup moins sensible sur l'activité des canalicules biliaires.

Tout en admettant la possibilité qu'il s'agisse d'enzymes divers, NOVIKOFF et ses collaborateurs sont d'avis que les différences de résistance au formol-calcium pourraient être reliées à des différences présentées par les structures où l'enzyme se localise.



Une explication de ce genre ne nous semble possible dans notre cas, car il s'agit — aussi bien chez le Triton et la Salamandre que chez la Tanche — d'une localisation dans le chondriome.

Peut-être pourrait-on attribuer à certaines différences qui se produisent lors de l'union de l'enzyme à des structures homologues, les différences de comportement de cet enzyme. On ne saurait toutefois exclure entièrement l'hypothèse relative à la présence d'enzymes différents, lesquels agissent sur un même substrat spécifique. Rappelons à ce propos que MYERS et SLATER (1957) admettent l'existence de quatre ATPases différentes dans les mitochondries du foie du Rat.

La localisation de la succino-déshydrogénase a été démontrée de façon très précise; cet enzyme présente un maximum d'activité au niveau du segment à bâtonnets où se trouve une quantité considérable de chondriome.

Nous ne croyons pas que la 5-nucléotidase aie été étudiée jusqu'ici chez le Triton.

Les résultats que nous avons obtenus à ce propos ont été souvent inconstants, au point de nous faire douter du caractère spécifique de la réaction obtenue.

Deux faits nous semblent cependant évidents et nous estimons intéressant de les souligner:

1. Les deux méthodes employées — au Pb de WACHSTEIN et MEISEL et au Ca de GOMORI — mettent en évidence une activité enzymatique qui a essentiellement la même localisation mais la première est plus intense et plus précise que la seconde;

2. L'activité enzymatique qui opère sur l'acide adénosine 3-phosphorique a une localisation nettement différente de celle qui agit sur l'acide adénosine 5'-phosphorique. Il est donc permis de supposer qu'il s'agit de deux enzymes différents, lesquels hydrolisent de façon spécifique chacun des deux substrats.

### Résumé

Les auteurs ont étudié le rein de *Triturus cristatus carnifex* (LAUR.) au point de vue anatomique, cytologique et cytochimique. Venant confirmer des données d'auteurs précédents, ils ont signalé la présence dans le rein de cet Urodèle de deux régions, *rein génital* et *rein pelvien*, lesquelles diffèrent quant à leur aspect, à la disposition des néphrons et aux rapports que la première de ces régions entretient, chez le mâle, avec la gonade. Ils soulignent les différences qui caractérisent les néphrons du rein génital chez les deux sexes.

Ces recherches confirment la présence dans le néphron du Triton de cinq segments qui se suivent dans l'ordre ci-après: collet cilié, segment à bordure en brosse que l'on peut diviser en deux tronçons  $P_1$  et  $P_2$ , segment intermédiaire cilié, segment à bâtonnets, segment d'union. De nombreux néphrostomes constituent autant de communications entre les néphrons et le coelome. De ces néphrostomes part un canal néphrostomial souvent assez long, canal qui, après un parcours ondulé, débouche dans un collet. Dans le rein génital du mâle, les néphrostomes font défaut.

La position des différents segments du néphron dans le rein correspond à celle observée par d'autres auteurs chez des Urodèles d'espèces différentes: les glomérules, les segment à bâtonnets et les néphrostomes sont situés dans la

région ventrale; dans les régions dorsale et dorso-latérale, on trouve au contraire les segments à bordure en brosse: les collets et les segments intermédiaires sont situés entre ces deux régions.

Le diamètre du néphron est variable; il atteint son minimum au niveau du collet et du segment intermédiaire.

Dans la région apicale des cellules du collet on a observé des granulations P.A.S. positives qui font défaut dans les autres segments ciliés du néphron (canal néphrostomial et segment intermédiaire). Parmi les activités enzymatiques étudiées, seule la 5-nucléotidase est présente dans le collet.

La distribution différente des substances P.A.S. positives et du pigment permet de diviser le segment à bordure en brosse en deux tronçons  $P_1$  et  $P_2$  qui passent progressivement l'un dans l'autre. Dans  $P_1$  le matériel P.A.S. positif est formé de fines granulations presque toujours situées au dessus du noyau — granulations qui sont aussi HALE et F.P. positives — et d'amas irréguliers situés à la base de la cellule et le long des limites cellulaires. Dans  $P_2$  les substances P.A.S. positives sont formées par contre de granulations de dimension variable; généralement d'une certaine dimension, ces granulations sont situées en position paranucléaire; elles sont HALE, F.P. positives et nettement acidophiles.

Tout le matériel P.A.S. positif mentionné ci-dessus ne semble guère être de nature mucopolysaccharide acide ni de nature glycogénique.

Dans  $P_2$  on observe des gouttes de pigment jaune-brun, faiblement F.P. positif, pigment qui constitue le caractère le plus typique de ce segment.

Dans tout le segment à bordure en brosse les cellules revèlent une faible pyroninophilie cytoplasmatique qui semble légèrement plus accentuée dans  $P_2$ . Dans  $P_2$ , et plus particulièrement dans sa moitié distale, on observe de fréquentes images difficiles à préciser au microscope optique: ces images pourraient être attribuées aussi bien à des phénomènes de sécrétion que d'absorption.

Le segment à bordure en brosse est le le segment où l'on peut démontrer histochimiquement le plus grand nombre d'activités enzymatiques. On a pu confirmer en effet la présence et la localisation de l'activité phosphatasique alcaline non spécifique aussi bien que de celle acide et décrire la localisation de celles lipasique, glucose 6-phosphatasique et 5'-nucléotidasique. L'activité succino-déshydrogénasique et celle ATPasique, au niveau du chondriome, sont très faibles.

Le segment intermédiaire cilié est caractérisé par l'absence de substances P.A.S. positives dans ses cellules.

Le caractère le plus évident du segment à bâtonnets est fourni par sa richesse en chondriome, par la présence de matériel bleu alcian positif dans quelques-unes de ses cellules, et par l'intensité des réactions ATPasique et succino-déshydrogénasique. Dans le tiers distal de ce segment on peut mettre en évidence une faible activité lipasique.

Lors de la discussion, les auteurs insistent tout particulièrement sur les données histochimiques obtenues, notamment en ce qui concerne le comportement des systèmes enzymatiques et le caractère spécifique des réactions obtenues dans le cadre des conditions techniques adoptées.

## Bibliographie

- ANDERSON, E.: The ultramicroscopic structure of a Reptilian Kidney. *J. Morph.* **106**, 205—229 (1960).
- , and H. W. BEAMS: The ultramicroscopic structure of the renal glomerulus of a lizard. *Anat. Rec.* **131**, 527 (1958).
- ARON, M.: Recherches morphologiques et expérimentales sur le déterminisme des caractères sexuels secondaires males chez les Urodèles. *Arch. Biol. (Liège)* **34**, 1 (1924).
- ARVY, L.: Répartition des activités phosphomonoestérasiques acides et estérasiques non spécifiques chez quelques batraciens urodèles. *C. R. Ass. Anat.* **43—94**, 156—164 (1957).
- , et M. GABE: Données histochimiques sur la répartition des activités phosphatasiques alcalines chez quelques batraciens. *Arch. Biol. (Liège)* **64**, 113—131 (1953).
- BARGMANN, W.: Untersuchungen über Histologie und Histophysiologie der Fischniere. I Dipnoer; *Lepidosiren paradoxa*. *Z. Zellforsch.* **21**, 388—411 (1934).
- Über sezernierende Zellelemente in Nephron von *Xenopus laevis*. *Z. Zellforsch.* **25**, 764—768 (1937).
- A. KNOOP u. Th. SCHIEBLER: Histologische, cytochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nephron (mit Berücksichtigung der Mitochondrien). *Z. Zellforsch.* **42**, 386—422 (1955).
- BEAUMONT, J. DE: Les caractères sexuel du Triton et leur déterminisme. Masculinisation et féminisation. *Arch. Biol. (Liège)* **39**, 175—270 (1929).
- BERTELLI, R.: Ricerche istologica sulla struttura e sulla funzione degli epiteli del rene. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **2**, 989—995 (1927).
- I fenomeni escretori delle cellule renali con orlo a spazzola. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **4**, 1262—1264 (1929).
- CHASE, S. W.: The mesonephros and urogenital ducts of *Necturus maculosus* (Rafinesque). *J. Morph.* **37**, 457—531 (1923).
- CHESSICK, R. D.: Histochemical study of the distribution of esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 471—485 (1953).
- CHIQUEONE, D. A.: The distribution of glucose 6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 429—435 (1953).
- Further studies on the histochemistry of glucose-6-phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 471—478 (1955).
- DEANE, H. W., R. J. BARNETT u. A. M. SELIGMAN: Enzymes. In: *Handbuch der Histochemie*, vol. VII, part. I. Stuttgart: Gustav Fischer 1960.
- DELSOL, M.: Repartition histochimique des phosphatases alcalines chez quelques vertébrés inférieurs: Batraciens et Poissons. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **147**, 1184—1186 (1953).
- DUVE, C. DE, and J. BERTET: The use of differential centrifugation of tissue enzymes. *Int. Rev. Cytol.* **3**, 225—275 (1954).
- EDWARDS, J. G.: Functional sites and morphological differentiation in the renal tubule. *Anat. Rec.* **55**, 343—368 (1933).
- The renal unit in the Kidney of vertebrates. *Amer. J. Anat.* **53**, 55 (1933).
- ERÄNKÖ, O., and C. LETHO: Distribution of acid and alkaline phosphatases in human meta-nephros. *Acta anat. (Basel)* **22**, 277—288 (1954).
- FARQUHAR, M. G., and G. E. PALADE: Segregation of Ferritin in glomerular protein absorption droplets. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 297—304 (1960).
- FERRERI, E.: Ricerche biochimiche su alcuni enzimi (fosfomonoesterasi alcalina e acida, esterasi) del rene di *Triturus cristatus* carnifex LAUR. Nota preventiva. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **36**, 1176—1178 (1960).
- , et A. PEYROT: Recherches biochimiques et histochimiques sur quelques enzymes du rein de *Triturus cristatus* carnifex LAUR. en conditions expérimentales. Communication au 1<sup>er</sup> Congr. Internat. d'Histochemie et Cytochemie, Paris 28 Août— 3 Sept. 1960.
- — Osservazioni istochimiche e biochimiche su alcuni enzimi del nefrone del Tritone crestato (*Triturus cristatus* carnifex) in condizioni sperimentali diverse. 1961 (sous presse).
- FOOTE, J. J., and A. L. GRAFFLIN: Quantitative measurement of the fat laden and fat free segments of the proximal tubule in the nephron of the cat and dog. *Anat. Rec.* **72**, 169—179 (1938).
- — Cell contours in the two segments of the proximal tubule in the cat and dog nephron. *Amer. J. Anat.* **70**, 1 (1942).



- FRANCIS, E. T. B.: The anatomy of the salamander. Cap. IX, The urino-genital system, pp. 277—288. Oxford: Clarendon Press 1934.
- GABE, M.: Contribution à l'histologie du rein de l'Hippocampe (*Hippocampus guttulatus*. CUVIER). Arch. Biol. (Liège) **68**, 29—43 (1957).
- Données histochimiques sur le rein de *Vipera aspis* (L.). Ann. Histochem. **4**, 23—31 (1959).
- Données histochimiques sur le rein de *Protoplerus annectens* (OWEN). Ann. Histochem. **4**, 51—58 (1959).
- GALGANO, M.: Il ciclo sessuale annuale in *Triturus cristatus carnifex* (LAUR.). I. Il ciclo naturale nei due sessi. Arch. ital. Anat. Embriol. **50**, 1—148 (1944).
- Il ciclo sessuale annuale in *Triturus cristatus carnifex* (LAUR.). II. Azione della temperatura e di altri fattori ambientali sul ciclo maschile e femminile. Arch. zool. ital. **37**, 33—207 (1947).
- GERARD, P.: Comparative histophysiology of the vertebrate nephron. J. Anat. (Lond.) **70**, 354—378 (1936).
- Organes urogénitaux. En GRASSÉ Traité de Zoologie, vol. XII, pp. 974—1042. Paris: Masson & Cie. 1954.
- et R. CORDIER: Esquisse d'une histophysologie comparée du rein des vertébrés. Biol. Rev. **9**, 110—131 (1934).
- GLENNER, G. G., and M. S. BURSTONE: Esterase and phosphatase activity in *Necturus maculosus*. A study in comparative histoenzymology. Anat. Rec. **130**, 243—252 (1958).
- GOMORI, G.: Microscopic histochemistry. Principles and Practice, II ed. Chicago: Chicago Univ. Press 1953.
- GRAFFLIN, A. L.: The structure of nephron in fishes. Representative types of nephron encountered; the problem of homologies among the differentiated portion of proximal convoluted segment. Anat. Rec. **68**, 287—303 (1937).
- GRAY, P.: The development of the Amphibian kidney. Part. II. The development of *Triton vulgaris* and a comparison of this form with *Rana temporaria*. Quart. J. micr. Sci. **75**, 425—465 (1932).
- HAM, A. W.: Histology, Cap. 26, Urinary system, pp. 655—693. Philadelphia: J. B. Lippincot Comp. 1957.
- HEIDENHAIN, R.: Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Niere. Arch. mikr. Anat. **10**, 1—50 (1874).
- HEIDINGER (1888): Cité par Vignon 1897.
- HOLT, S. J.: Factors governing the validity of staining methods for enzymes and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique. Exp. Cell Res., Suppl. **7**, 1—27 (1959).
- HÜFNER: Zur vergleichenden Anatomie und Physiologie der Harnkanälchen. Inaug.-Diss. Leipzig 1866. Cité par POLICARD 1910.
- JAFFEE, O. C.: Some morphological aspects of protein absorption in isolated renal tubules of the goldfish (*Carassius auratus*). Anat. Rec. **125**, 495—508 (1956).
- Some morphological aspects of the resorption of carbohydrate in the renal tubules of the goldfish (*Carassius auratus*). Anat. Rec. **132**, 153—159 (1958).
- JASSWOIN, G.: Zur Histophysologie der Tubuli contorti der Amphibien Niere. Z. Zellforsch. **2**, 741—765 (1925).
- KRECHMER, N., and H. W. DICKERMAN: Cellular mechanism of protein metabolism in the nephron. J. exp. Med. **99**, 629—635 (1954). Cité par JAFFEE.
- LAMBERT, P. P.: Contribution à l'hystophysologie rénale chez les Urodeles. Arch. Biol. (Liège) **47** (2), 125—179 (1936).
- LASCANO GONZALES, J. M.: Zur Morphologie der Nierensekretion an den Hauptzellen. Z. mikr.-anat. Forsch. **28**, 349 (1932).
- LEE, Y. C.: Cellular mechanism of protein metabolism in the nephron. III. The histochemical characteristics of amino acid droplets. J. exp. Med. **99**, 234—241 (1953).
- LONGLEY, J. B.: Alkaline phosphatase in kidneys of aglomerular fishes. Science **123**, 142 (1956).
- , and E. R. FISHER: Alkaline phosphatase and the periodic acid Schiff reaction in the proximal tubule of the vertebrate kidney. Anat. Rec. **120**, 1—22 (1954).
- MANGIONE, F.: Sulla differenziazione segmentale del tubulo prossimale del nefrone. Arch. ital. Anat. Embriol. **62**, 1—54 (1957).

- MAXIMOW, A. A., and W. BLOOM: A textbook of Histology. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company 1957.
- MAZZI, V.: Caratterizzazione citologica e citochimica del nefrone di *Cyprinus carpio* L. Z. Zellforsch. **47**, 631—647 (1958).
- , e A. PEYROT: Localizzazioni enzimatiche nel tubulo renale della Tinca (*Tinca tinca* L.). Riv. Istoch. norm. pat. (1961, sous presse).
- MEWES: Über den Einfluß der Zelltheilung auf den Sekretionsvorgang etc. Festschr. S. C. VON KUPFFER, pp. 57—62. 1899. Cité par POLICARD.
- MÖLLENDORFF, W. v.: Der Exkretionsapparat. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Berlin: Springer 1930.
- MYERS, D. K., and E. C. SLATER: The enzymic hydrolysis of Adenosine Triphosphate by liver mitochondria. I. Activities at different  $p_H$  values. Biochem. J. **67**, 558—572 (1957).
- NOVIKOFF, A. B.: Esterase-rich bodies in osmium-fixed cells of rat kidney and liver. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 127—128 (1957).
- Distinguishing substrate-specific phosphatase. J. Histochem. Cytochem. **6**, 251—254 (1958).
- NOVIKOFF, A. B., D. HAUSMAN and E. PODBER: The localisation of adenosine triphosphatase in liver: in situ staining and cell fractionation studies J. Histochem. Cytochem. **6**, 61—71 (1958).
- NUSSBAUM, M.: Fortgesetzte Untersuchungen über die Sekretion der Niere. Pflügers Arch. ges. Physiol. **16**, 139—142 (1878a).
- Fortgesetzte Untersuchungen über die Sekretion der Niere. Pflügers Arch. ges. Physiol. **17**, 580—591 (1878b).
- Zur Kenntnis der Nierenorgane. Arch. mikr. Anat. **27**, 442—480 (1886).
- OLIVER, J.: The structure of metabolic process in the nephron. J. Mt. Sinai Hosp. **15**, 137 (1948).
- M. MAC DOWELL and Y. C. LEE: Cellular mechanism of protein metabolism in the nephron. I. The structural aspect of proteinuria, tubular absorption, droplet formation and the disposal of protein. J. exp. Med. **99**, 589 (1954).
- W. STRAUS, N. KRETCHMER, Y. C. LEE, H. W. DICKERMAN and F. CHEROT: The histochemical characteristics of absorption droplets in the nephron. J. Histochem. Cytochem. **3**, 277—283 (1955).
- PADIKULA, H. A.: The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat. Amer. J. Anat. **91**, 107—146 (1952).
- PAK POI, R. K. F.: Electron microscopy of the Amphibian renal glomerulus. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **35**, 583—594 (1957).
- Electron microscopy of the reptilian glomerulus. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **37**, 153—162 (1959).
- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry theoretical and applied. London: J. & A. Churchill Ltd. I<sup>o</sup> ed. 1953; II<sup>o</sup> ed. 1960.
- PEASE, D. C.: Fine structure of the kidney seen by electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. **3**, 295—308 (1955a).
- Electron microscopy of the tubular cells of the kidney cortex. Anat. Rec. **121**, 723 (1955b).
- Electron microscopy of the vascular bed of the kidney cortex. Anat. Rec. **121**, 701 (1955c).
- , and R. F. BAKER: Electron microscopy of the kidney. Amer. J. Anat. **87**, 349—389 (1950).
- PEYROT, A.: Ricerche isotopochimiche su alcuni enzimi del nefrone di *Triturus cristatus carnifex* (LAUR). Nota preliminare. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **36**, 993—996 (1960).
- POLICARD, A.: Les divers segments du tube urinaire du rein des Mammifères. C. R. Soc. Biol. (Paris) **62**, 369 (1907).
- Contribution à l'étude du mécanisme de la sécrétion urinaire. Le fonctionnement du rein de la grenouille. Arch. Anat. micr. **12**, 177—288 (1910).
- PRESTAGE, J. J., and H. W. BEAMS: The structure of renal corpuscle in the sparrow, *Passer domesticus domesticus*, as revealed by the electron microscope. Proc. Iowa Acad. Sci. **64**, 67—79 (1957).

- REGAUD, CL.: Variations des formations mitochondriales dans les tubes à cuticule striée du rein. C. R. Soc. Biol. (Paris). **64**, 1145 (1908).
- Participation du chondriome à la formation des grains de sécrétion dans les cellules des tubes contournés du rein (chez les Ophidiens et les Amphibiens). C. R. Soc. Biol. (Paris) **66**, 1034 (1909).
- , et A. POLICARD: Notes histologiques sur la sécrétion rénale. C. R. Soc. Biol. (Paris), Séance du 28 déc. 1901. Cité par POLICARD 1910.
- REMOTTI, E.: Istofisiologia comparata del nefrone. Boll. Soc. ital. Biol. Sper. **9**, (7) 528—604 (1936).
- RHODIN, J.: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubules of the mouse kidney. Stockholm 1954. Cité par JAFFEE 1956.
- Anatomy of kidney tubules. Int. Rev. Cytol. **7**, 485—534 (1958).
- RICHTERICH, R.: Über die Lokalisation einiger Esterasen in verschiedenen Organen des Albinomaus. Acta anat. (Basel) **14**, 342—352 (1952).
- SIEKEVITZ, PH.: On the meaning of intracellular structure for metabolic regulation. Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism, pp. 17—57. London: J. & A. Churchill, Ltd. 1959.
- SJÖSTRAND, F. S., and J. RHODIN: The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. Exp. Cell. Res. **4**, 426—456 (1953).
- SOULAIRAC, A.: La localisation histochemique de la phosphatase alcaline (Phosphomono-estérase) dans le tube digestif et le rein du Rat. C. R. Soc. Biol. (Paris) **142**, 645—646 (1948).
- SPATER, H., A. NOVIKOFF and B. MASEK: Adenosinetriphosphatase Activity in the cell membranes of kidney tubule cells. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 765—770 (1958).
- SPENGLER, J. W.: Das Urogenitalsystem der Amphibien. Arb. zool. Inst. Würzburg **3**, 1—108 (1876).
- STRAUS, W.: Concentration of acid phosphatase, ribonuclease, desoxiribonuclease, glucuronidase and cathepsin in „droplets” isolated from the kidney cells of normal rats. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 513—521 (1956).
- Segregation of an intravenously injected protein by „droplets” of the cells of rat kidneys. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 1037—1040 (1957).
- TURCHINI, J.: Contribution à l'étude de l'histophysiologie rénale. Les processus cytologiques de l'élimination des matières colorantes par le rein. Arch. Morph. gén. exp. **11**, 1—109 (1922).
- VIGNON, P.: Les canalicules urinaires chez les Vertébrés. Ann. Biol. **3**, 277—308 (1897).
- WACHSTEIN, M.: Influence of experimental kidney damage on histochemically demonstrable lipase activity in the Rat. Comparison with alkaline phosphatase activity. J. exp. Med. **84**, 25—36 (1946).
- Histochemical demonstration of esterase activity in the normal human kidney and renal carcinoma. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **79**, 680—682 (1952).
- Histochemical staining reactions of the normally functioning and abnormal kidney. J. Histochem. Cytochem. **3**, 246—270 (1955).
- , E. MEISEL and A. NIEDRWITZ: Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead-adenosine triphosphate technique. J. Histochem. Cytochem. **8**, 387—388 (1960).
- WIEDERSHEIM, R.: Compendio di anatomia comparata dei vertebrati. Ed. Ital. a cura di G. CATTANEO. Milano: Ed. VALLARDI, 11ed., 1888.
- WILLMER, E. N.: Cytology and Evolution. New York and London: Acad. Press 1960.
- WILMER, H. A.: Renal phosphatase. Arch. Path. Lab. Med. **37**, 227—237 (1944).
- YAMADA, E.: Collagen fibrils within the renal glomerulus. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 407—408 (1960).
- ZORZOLI, G. C., e E. RAVIOLA: Ricerche istochimiche sul pigmento presente nell'epitelio dei tubuli renali di *Salamandra maculosa*. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 533—536 (1955).
- , e C. SBERNINI: Ricerche istichimiche sul pigmento presente nell'epitelio dei tubuli renali di *Esox lucius*. Monit. zool. ital. **63**, Suppl., 403—408 (1954).



Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen  
(Direktor: Prof. Dr. med. E. LETTERER)

## ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER NACHWEIS VON FETTPARTIKELN IM DISSESCHEN RAUM\*

Von

RUDOLF CAESAR

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. April 1961)

Im Rahmen einer elektronenmikroskopischen Untersuchung über die Wirkung von Toxinen auf die Leberzelle fielen uns im Disseschen Raum der Meerschweinchenleber zahlreiche kleine, stark schattengegebende Partikel auf. Diese Partikel stellen ein verkleinertes Abbild der intrazellulär in Leberzellen gelegenen Fetttropfen dar. Ihre Zahl läßt sich zum Gehalt an intrazellulärem Fett etwa in Parallele setzen. Bei der systematischen Durchmusterung von Lebern normaler Meerschweinchen und anderer Laboratoriumstiere sahen wir, daß solche Tröpfchen regelmäßig im Disseschen Raum vorkommen. Wir zweifeln nicht, daß es sich hierbei um kleine Fettpartikel, d.h. um Chylomikronen, handelt.

Da dem morphologischen Nachweis von Chylomikronen im Disseschen Raum sowohl für Fragen des Fetttransportes wie für allgemein-pathologische Fragestellungen Interesse zukommt, möchten wir die Befunde etwas eingehender mitteilen.

### Material und Methode

Untersuchung von Lebern von drei normalen Meerschweinchen, von fünf Meerschweinchen nach Vergiftung mit Diphtherietoxin (etwa 0,5 DLM Diphtherietoxin sc., Tötung nach 1—4 Tagen), weiterhin von zwei Ratten jeweils 2½ und 5 Std nach Ölfütterung mit Schlundsonde (1 ml Olivenöl) sowie von fünf normalen Mäusen. Tötung der Tiere durch Decapitation in Äthernarkose. Sofortige Entnahme kleiner Leberstücke, Fixation in OsO<sub>4</sub>, Einbettung in Vestopal. Schnitte wurden mit einem Porter-Blum-Mikrotom hergestellt und teilweise mit Bleisalzen (WATSON 1958) kontrastiert. Elektronenmikroskopische Untersuchung mit einem Siemens-Elmiskop I. Lichtmikroskopische Kontrolluntersuchung an Gefrierschnitten mit Sudanschwarz-Färbung zum Fettnachweis.

### Befunde

Die Feinstruktur des Disseschen Raumes ist aus den Untersuchungen von RÜTTNER und VOGEL (1958), COSSEL (1959) u.a. bekannt. Die v.Kupfferschen Sternzellen überziehen diesen etwa 0,5  $\mu$  breiten perisinusoidalen Spaltraum diskontinuierlich. Im Disseschen Raum liegen reticuläre Fasern, eine den Kapillaren eigentümliche Basalmembran fehlt. Zwischen den v.Kupfferschen Sternzellen zeigen sich kleine Lücken: das Blut mit seinen Bestandteilen besitzt hier freien Zugang zum Disseschen Spalt. Die zahlreichen kleinen Mikrovilli an der Oberfläche der Leberzellen tauchen also unmittelbar in die Blutflüssigkeit im Disseschen Raum ein (Abb. 1). Die Leberzelle wird damit befähigt, Stoffe direkt aus dem Blut ohne Vermittlung der Sinusendothelien aufzunehmen.

\* Die Untersuchung wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Im Disseschen Raum finden sich nun insbesondere beim Meerschweinchen, seltener bei der Ratte und der Maus, kleine, intensiv schattengegebende, rundliche

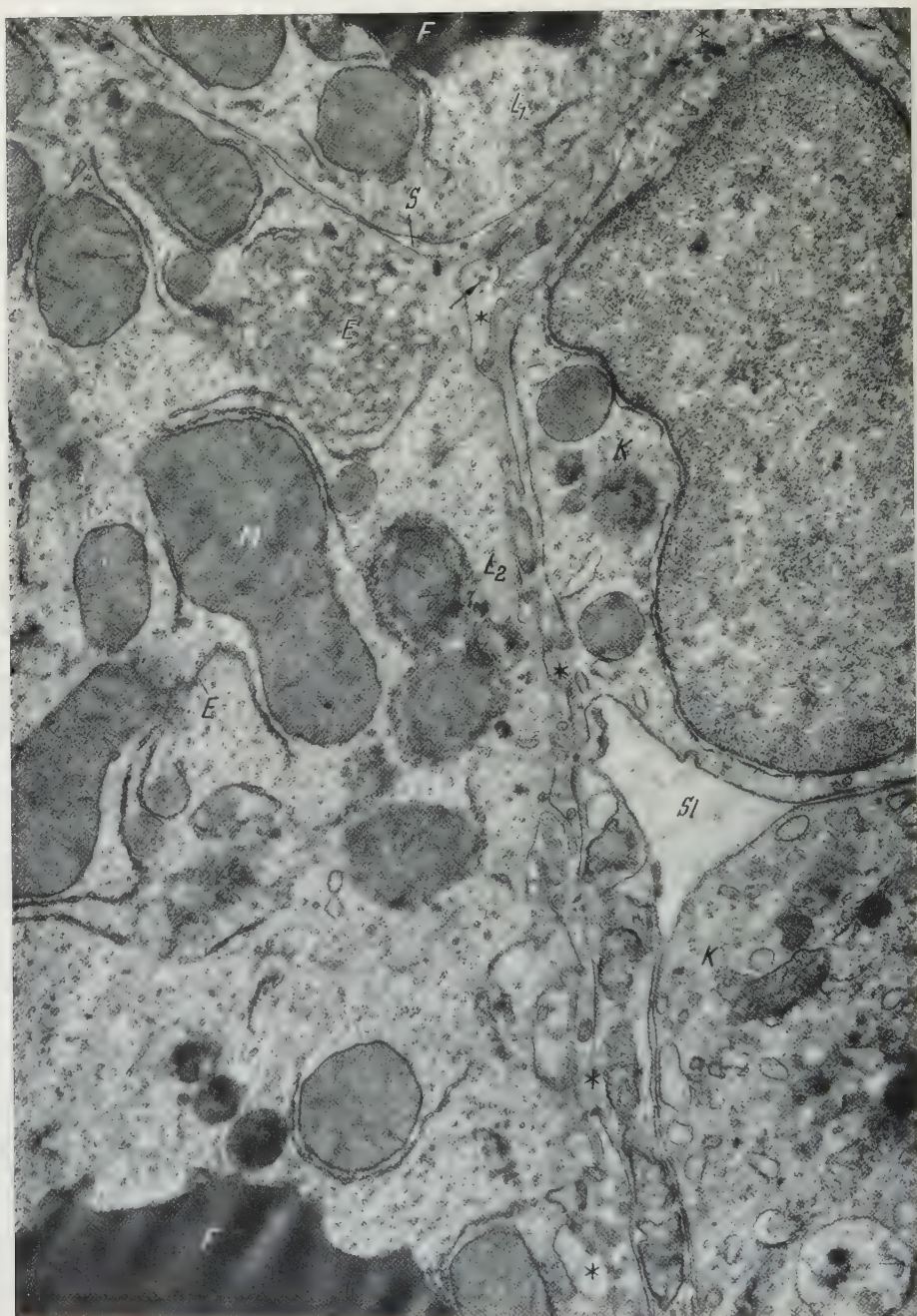


Abb. 1. Meerschweinchen, normale Leber. Beziehungen zwischen Leberzellen ( $L_1$  und  $L_2$ ), v. Kupffer'sche Sternzelle ( $K$ ) und Sinusoidlumen ( $SL$ ). Bei \* der Dissesche Raum, der Pfeil deutet auf einige Fettpartikel im Disseschen Raum. Bei  $F$  größere intrazelluläre Fettpartikel,  $M$  Mitochondrien,  $E$  endoplasmatisches Reticulum bzw. Ergastoplasma,  $S$  Interzellularspalt zwischen zwei Leberzellen.  
Vergr. 19500fach



Partikel (Abb. 2, 3). Ganz vereinzelt liegen derartige Partikel auch im Sinusoidlumen (Abb. 5). Sie besitzen einen mittleren Durchmesser von 60—80 m $\mu$ , sind

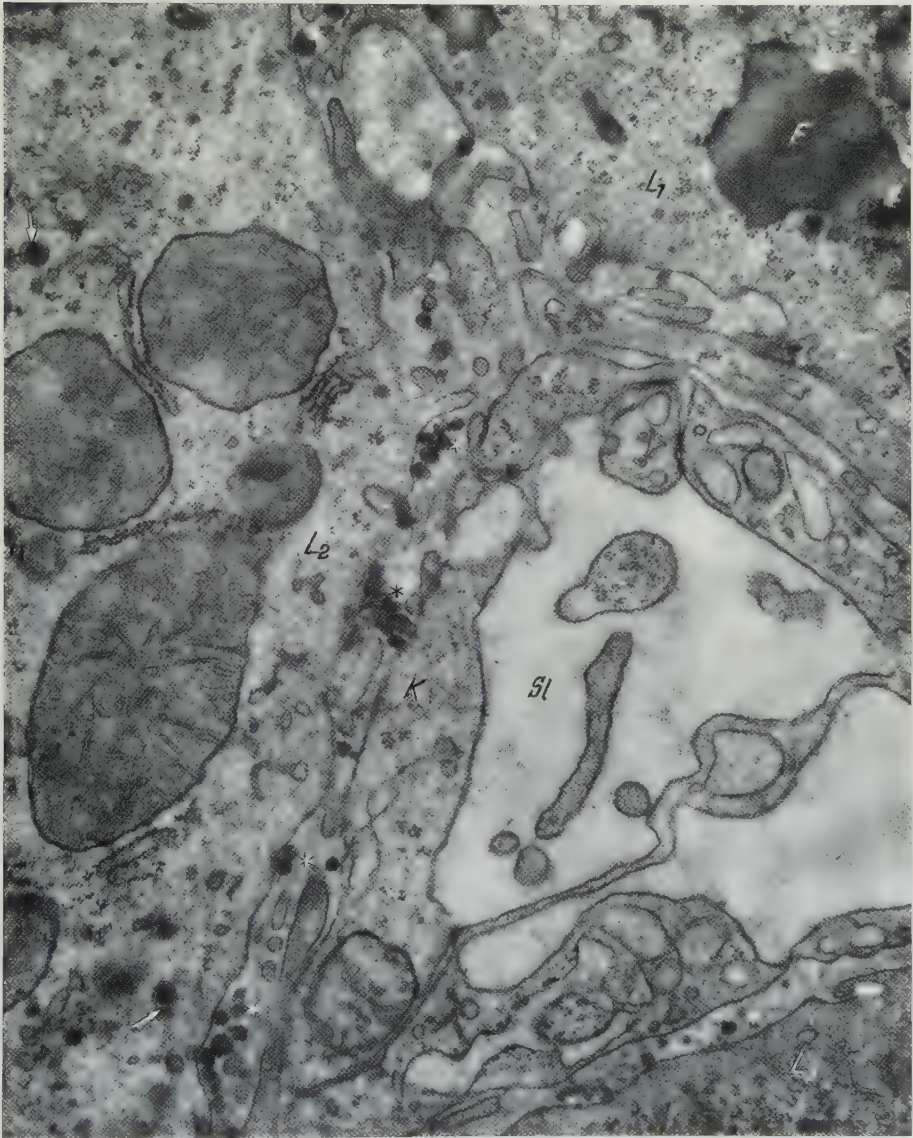


Abb. 2. Meerschweinchen, normale Leber. Bei \* Fettpartikel im Disseschen Raum. Die Pfeile deuten auf kleine intrazelluläre, teils von Membranen umhüllte Fettpartikel. Übrige Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Vergr. 27 500fach

völlig homogen, eine Membran an ihrer Oberfläche läßt sich nicht darstellen. Einige größere Partikel zeigen die für Fettsubstanzen nach Osmiumfixation und Plastikeinbettung typischen Schnitteffekte: Es treten bandartige, senkrecht zur Schnittrichtung stehende Zonen von Aufhellungen und Verdichtungen innerhalb dieser Partikel auf. Einen weiteren Hinweis, daß es sich um Fettsubstanzen,



d.h. also um Chylomikronen, handelt, entnehmen wir ihrer eindeutigen Häufung in stärker verfetteten Lebern. Der annähernd runden Form dieser Gebilde im

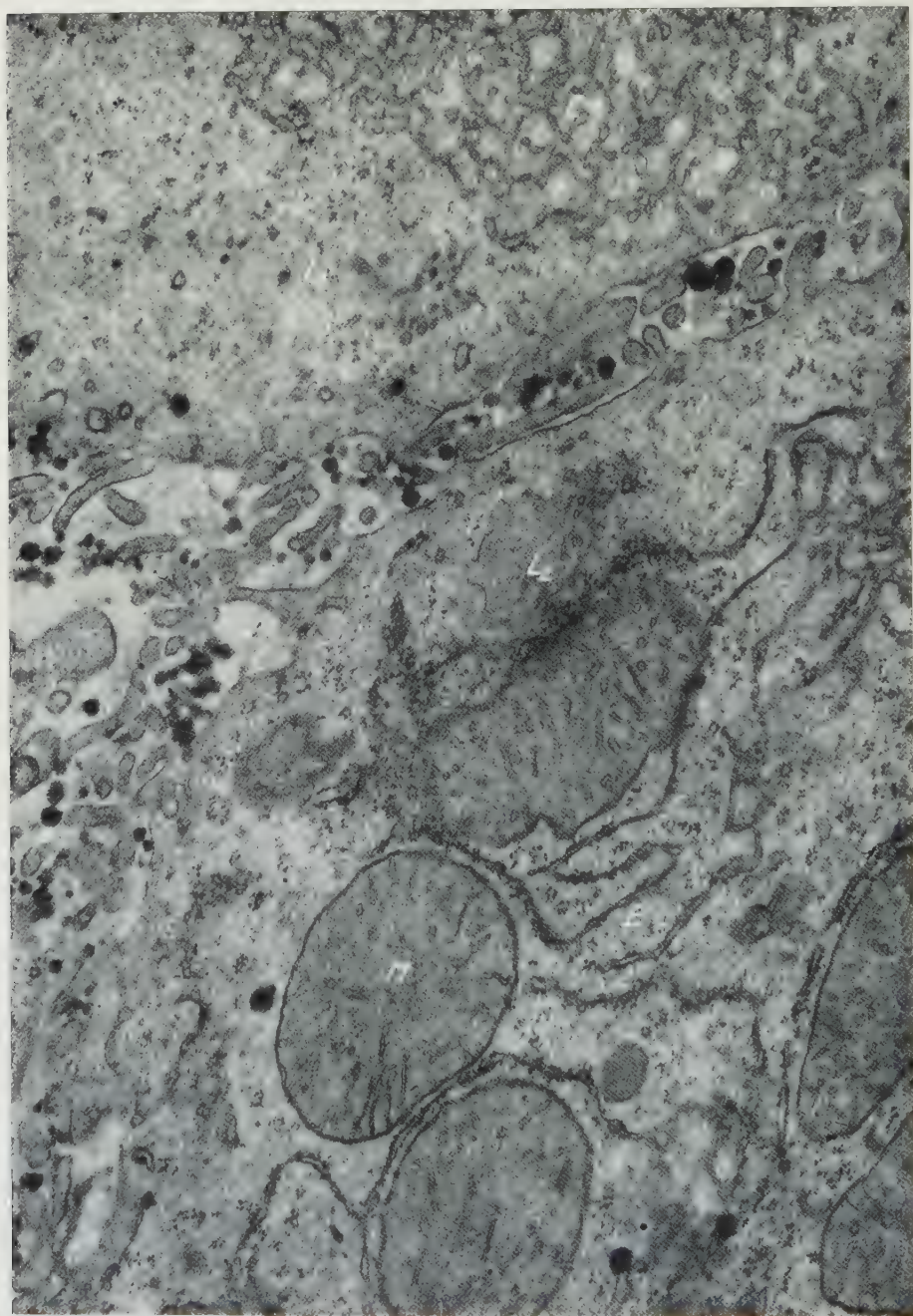


Abb. 3. Meerschweinchen, normale Leber. Weiter Dissescher Raum mit Fettpartikeln (→) und angrenzender Interzellularspalt (\*) zwischen zwei Leberzellen ebenfalls mit Fettpartikeln. Übrige Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Vergr. 32500fach

Schnitt muß eine reelle Kugel- oder Tropfenform entsprechen. Von querschnittenen retikulären Fasern sind die Chylomikronen durch ihren stärker

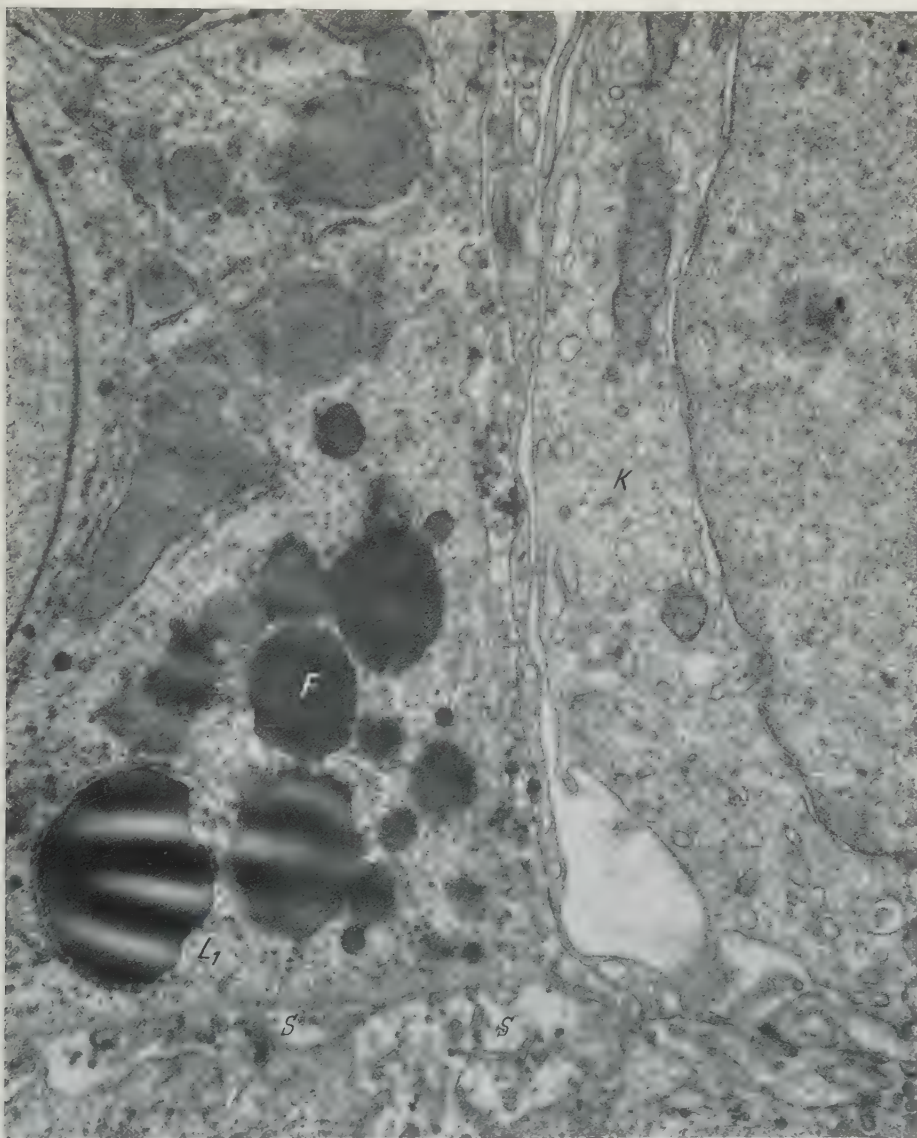


Abb. 4. Meerschweinchen, normale Leber. Schmäler Dissescher Raum mit Fetttropfen (\*), auch in der angrenzenden Leberzelle ( $L_1$ ) zahlreiche große Fetttropfen. Übrige Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Vergr. 16 500fach

wechselnden Durchmesser, ihre unregelmäßige Lagerung und durch ihr Verhalten gegenüber Schwermetallsalzen gut zu unterscheiden. Die retikulären Fasern sind ohne Kontrastierung nach Vestopaleinbettung kaum sichtbar, ihr Kontrast läßt sich durch Behandlung mit Phosphorwolframsäure kräftig erhöhen. Die Fetttropfchen sind bereits ohne Kontrastierung intensiv schattendicht, ihr Kontrast ist kaum durch Metallimprägnierung zu steigern.



Die Chylomikronen liegen wahllos im Dissesehen Raum verstreut, häufig schmiegen sie sich der Zellmembran einer Leberzelle an. Man findet sie mitunter auch in den schmaleren Teilen des Dissesehen Raumes, d.h. also dort, wo eine v.Kupffersche Sternzelle die Leberzelle fast berührt und die Oberfläche der Leberzelle nur wenig Mikrovilli aufweist. Das Auftreten von Fetttropfchen im interzellulären Spalt zwischen den Leberzellen scheint uns besonders bemerkenswert (Abb. 3 und 4). Wahrscheinlich können sich diese Tröpfchen vom

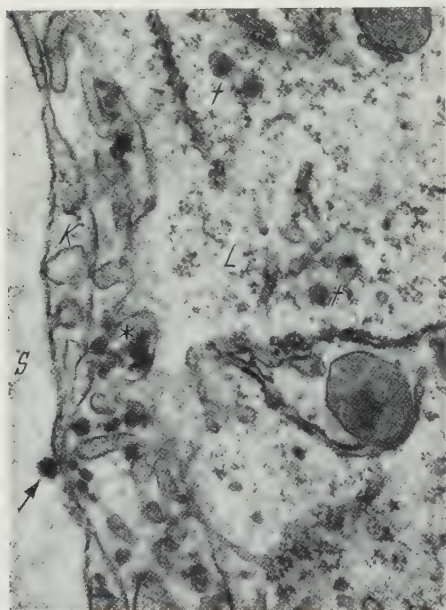


Abb. 5

Abb. 5. Meerschweinchen, normale Leber. Der Pfeil deutet auf ein Fettpartikelchen im Sinusoidlumen hin. Bei \* Fettpartikel im Dissesehen Raum, bei † intrazellulär kleine, z.T. von Membranen umhüllte Fettpartikel. Übrige Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Vergr. 32 500fach

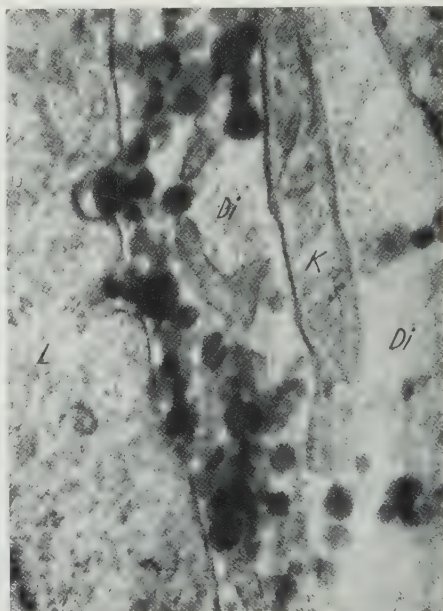


Abb. 6

Abb. 6. Meerschweinchen, normale Leber. Einbuchtungen der Leberzellmembran mit Fettpartikeln, auch im Dissesehen Raum (*Di*) zahlreiche Fettpartikel. Übrige Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Vergr. 41 250fach

Dissesehen Raum aus — entlang den Leberzellen — bis nahe an eine interzelluläre Gallenkapillare heranschieben. Die Gallenkapillaren selbst bleiben jedoch regelmäßig frei von Fett (Abb. 9). An einzelnen Stellen liegen die Tröpfchen im Dissesehen Raum im Bereich kleiner Einbuchtungen oder Einstülpungen der Leberzellmembran (Abb. 6). Bei den lichtmikroskopischen Kontrolluntersuchungen mit Sudanschwartz-Färbung zeigt sich eine betonte Leberzellverfettung in der Läppchenperipherie. Dementsprechend lassen sich die Chylomikronen elektronenoptisch überwiegend im Bereich der peripheren Läppchenanteile nachweisen; ihre Menge nimmt gegen das Läppchenzentrum hin deutlich ab.

Die Zahl der Chylomikronen im Dissesehen Raum variiert bei den einzelnen Tierarten (Meerschweinchen, Ratte, Maus). In der normalen Meerschweinchenleber trifft man regelmäßig reichlich Chylomikronen an, bei der Ratte seltener, bei der Maus nur vereinzelt. Diese Schwankungsbreite mag ihren Grund in einem unterschiedlichen Nahrungsaufnahme- und Verarbeitungszyklus besitzen. (Sämt-



liche Tiere erhielten Mischfutter ad libitum und wurden morgens vor der Futtergabe getötet!) Bei den Ratten findet sich  $2\frac{1}{2}$  und 5 Std nach Ölfütterung eine kräftige, vorwiegend großtropfige periphere Leberverfettung. Dementsprechend zeigen beide Tiere reichlich Fettpartikel im Disseschen Raum.

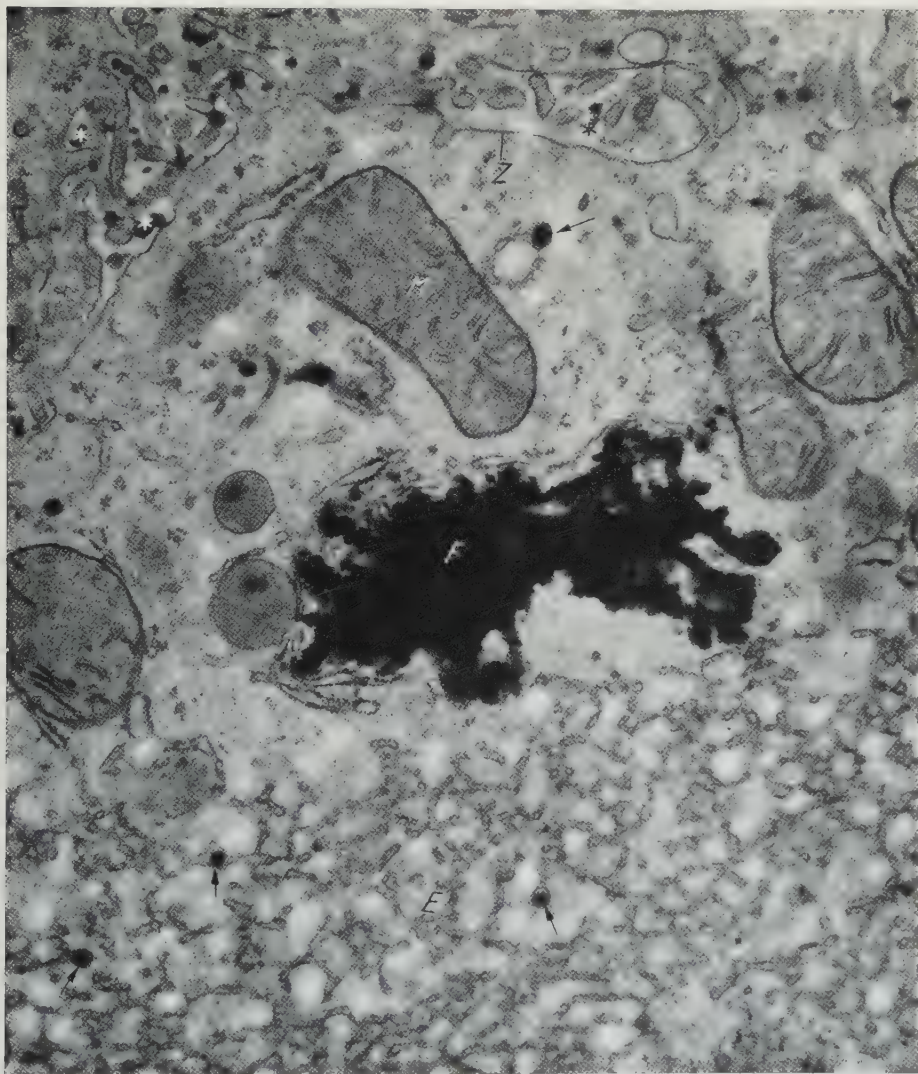


Abb. 7. Meerschweinchen, normale Leber. Im Disseschen Raum zahlreiche Fettpartikel (\*). Bei Z Leberzellmembran, die Pfeile deuten auf intrazelluläre, z.T. von Membranen umhüllte Fettpartikel. Übrige Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Vergr. 32500fach

Innerhalb der Leberzelle erscheint das Fett vorwiegend in Form größerer homogener Tropfen, daneben ist es auch in feintropfiger Form ( $60\text{--}80\text{ m}\mu$ ) abgelagert. Um einzelne dieser kleineren Fetttropfen läßt sich mitunter eine geschlossene Membran nachweisen (Abb. 5 und 7). Im Bereich des Golgi-Feldes findet sich regelmäßig feintropfiges, von Membranen umschlossenes Fett (Abb. 9).

Häufig bestehen ausgesprochene topische Beziehungen zwischen den Fetttropfchen innerhalb der Leberzelle (in Nähe der Zellmembran) und den Tröpfchen im Disseschen Raum. Besonders in stärker verfetteten Lebern werden diese Beziehungen deutlich. Mitunter liegen intrazellulär auch größere Fettaggregate von recht unregelmäßiger, nahezu bizarrer Gestalt (Abb. 7). Man gewinnt den Eindruck, daß die kleintropfigen Fettsubstanzen sich hier zu größeren Tropfen formieren oder auch umgekehrt größere Tropfen auseinanderfließen.

### Besprechung der Befunde

Das Vorkommen von Fettsubstanzen im Disseschen Raum und den Interzellularspalten zwischen den angrenzenden Leberzellen spricht beredt für reelle Existenz und Bedeutung des perisinusoidalen Spaltraumes. Während nur ganz vereinzelt Chylomikronen im Sinusoidlumen zu sehen sind, liegen sie im Disseschen Raum gehäuft. Nach biochemischen Untersuchungen (Lit. bei OLSON und VESTER 1960) unterstellen wir als richtig, daß die Chylomikronen auf dem Blutweg in die Leber transportiert werden. Aus dem gehäuften Auftreten von Fettpartikeln im Disseschen Raum darf man folgern, daß der Dissesche Raum unter Umständen eine Art Stapelplatz für die auf dem Blutweg transportierten Fettsubstanzen darstellt. Vom Disseschen Raum und den angrenzenden chylomikronenhaltigen Interzellularspalten aus kann das antransportierte Fett dann von der Leberzelle resorbiert werden.

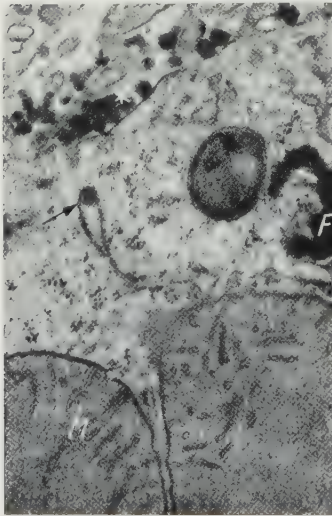


Abb. 8. Meerschweinchen, normale Leber. Teile einer Leberzelle mit angrenzendem Disseschen Raum, darin einige Fettpartikel (\*). Der Pfeil weist auf ein interzellulär gelegenes, von Membranen umhülltes Fettpartikelchen hin. *M* Mitochondrien, *F* Ausschnitt eines größeren Fetttropfens. Vergr. 32500fach

Aufbauend auf weit zurückliegenden lichtoptischen Beobachtungen von KÖLLIKER (1855) u. a. stellte PALAY (1959) den Weg des resorbierten Fettes durch die Darmwand mit elektronenoptischer Prägnanz dar. Danach gelangt das Fett durch Pinocytose in die Darmepithelzelle. Ein Fetttropfchen im Lumen des

Darmes stülpt sich mit der Zellmembran des Zottenepithels gleichsam ein, dieser Teil der Zellmembran schnürt sich ab, um das Fetttropfchen vollends „einzuwickeln“ und durch die Epithelzelle hindurchzuschleusen. An der Zellbasis wird das Fetttropfchen dann gegensinnig in den Lymphraum abgegeben. Auch in der Leber zeigen sich an der dem Disseschen Raum zugewandten Leberzellmembran einzelne Chylomikronen in Buchten und Einsenkungen der Membran. Die Größe dieser Partikel liegt im Bereich der von PALAY angegebenen Größenordnung für resorbierte Fettpartikel im Dünndarmepithel. Die eigentliche Abschnürung von Teilen der Leberzellmembran kann man naturgemäß nicht lückenlos beobachten. Allerdings liegt es sehr nahe, wie im Darmepithel so auch in der Leber, in den vereinzelt intrazellulären, von einer Membran umhüllten Fetttropfchen durch Pinocytose aufgenommene Partikel zu sehen. Wir können



nicht sicher erklären, warum im ganzen nur wenig von einer Membran umschlossene Fettpartikel in der Leberzelle zu beobachten sind. Vielleicht dauert die Um-

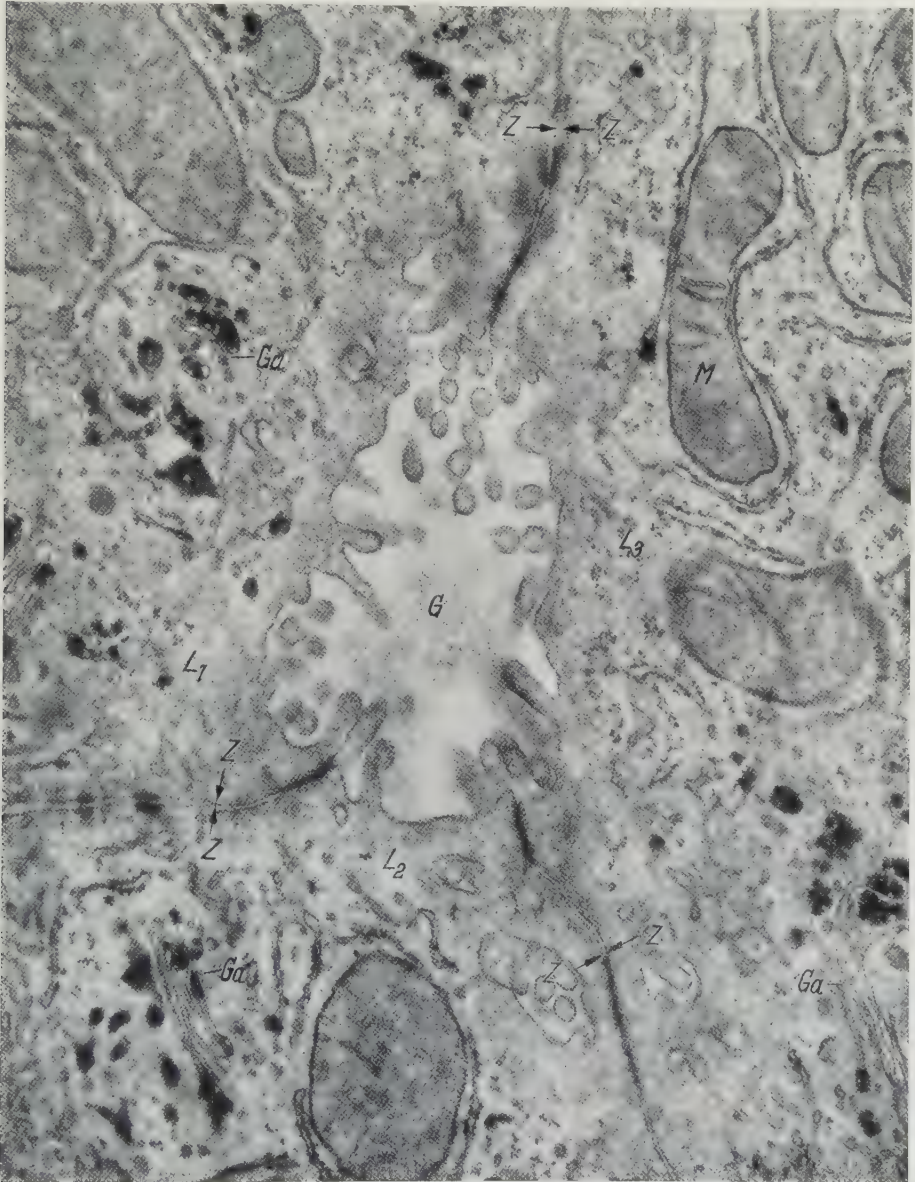


Abb. 9. Meerschweinchen, normale Leber. Im Zentrum Gallenkapillare, ringsum drei Leberzellen ( $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ ). Bei  $Z$  Leberzellmembranen. Ablagerung von Fettpartikeln peribiliär im Bereich des Golgi-Apparates. Die Fettpartikel sind größtenteils von den Membranen des Golgi-Apparates umhüllt.  
Vergr. 32500fach

hüllung des mittels Pinocytose resorbierten Fettes durch Membranen nicht an: Die Membranen schwinden bei der Verarbeitung des Fettes, die kleineren Tröpfchen fließen zu größeren zusammen.



Die Zahl der untersuchten Tiere ist zu gering, als daß man über das Verhalten der Chylomikronen in Abhängigkeit von der Fütterungsweise, von Tag- und Nachtrhythmus und von der Topik des Leberläppchens her Einzelheiten aussagen kann. Unter den hier gezeigten Verhältnissen überwiegt das Vorkommen von Chylomikronen in der Läppchenperipherie, ein Hinweis dafür, daß von der Peripherie an das Leberläppchen herantransportierte Fette auch in der Peripherie zuerst resorbiert werden.

### Zusammenfassung

Im Disseschen Raum der Leber von Meerschweinchen, Ratten und Mäusen findet man elektronenmikroskopisch regelmäßig kleine *Fettpartikel* mit einem größten Durchmesser von etwa  $80\text{ m}\mu$ . Derartige Fettpartikel treten auch in den mit dem Disseschen Raum in Verbindung stehenden Interzellularspalten (zwischen benachbarten Leberzellen) auf. Hier und da stülpt sich die Leberzellmembran ein, die Fetttröpfchen kommen damit in tiefe Buchten und Einsenkungen der Leberzelloberfläche zu liegen. Mitunter erscheinen auch im Cytoplasma der Leberzellen kleine von Membranen umhüllte Fetttröpfchen. Diese Beobachtungen sprechen für einen korpuskulären Übertritt von Fetttröpfchen aus dem Disseschen Raum in die Leberzelle. Sehr wahrscheinlich werden Fettpartikel von der Leberzelle, wie es vom Zottenepithel des Darmes bereits bekannt ist, durch Pinocytosevorgänge aufgenommen.

### Literatur

- COSSÉL, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage des Disseschen Raumes in der Leber. *Klin. Wschr.* **37**, 743—753 (1959).
- KÖLLIKER, A.: Nachweis eines besonderen Baues der Cylinderzellen des Dünndarmes, der zur Fettresorption in Bezug zu stehen scheint. *Verh. phys.-med. Ges. Würzb.* **6**, 253 (1855).
- OLSON, R. E., and J. W. VESTER: Nutrition — Endocrine interrelationships in the control of fat transport in man. *Physiol. Rev.* **40**, 4 (1960).
- PALAY, S. L., and L. J. KARLIN: An electron microscope study of the intestinal villus. II. The pathway of fat absorption. *J. biophys. biochem. Cytol.* **5**, 373—384 (1959).
- RÜTTNER, J. R., u. A. VOGEL: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Lebersinusoidwand. 41. Tagg. der Dtsch. Ges. für Pathologie, 1957.

Dr. RUDOLF CAESAR, Pathologisches Institut der Universität  
Tübingen a. N., Liebermeisterstraße 8

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg  
(Direktor: Prof. Dr. med. et phil. E. HORSTMANN)

## ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DES INTRA- ZELLULÄREN STOFFTRANSPORTES IN DER DÜNNDARM- EPITHELZELLE NACH MARKIERUNG MIT MYOFER

Von  
W. SCHMIDT

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. April 1961)

Im Rahmen ausgedehnter Untersuchungen über das morphologische Substrat der Vitalfärbung mit den herkömmlichen Farbstoffen (SCHMIDT 1960, 1961) wurde versucht, Stoffe zu finden, die den Weg und den Mechanismus der intrazellulären Verarbeitung von physiologischen Resorbaten licht- und elektronenmikroskopisch zu verfolgen gestatten. Solche Modellsubstanzen mußten folgenden Forderungen entsprechen: Gewebsfreundliches Verhalten, keine toxische Wirkung, gute Fixierbarkeit bei der Präparation und die Möglichkeit des sicheren licht- und elektronenmikroskopischen Nachweises. Diesen Anforderungen entsprach „Myofer“ als Vertreter für Polysaccharide bisher in nahezu idealer Weise.

„Myofer“ (Hoechst) stellt einen makromolekularen Stoff mit einem mittleren Molekulargewicht von 75000 dar, in dem dreiwertiges Eisen an Dextran gebunden ist. Diese Bindung ist so fest, daß bei der Passage in den meisten bisher untersuchten Zelltypen keine nachweisbare Spaltung erfolgt. Infolgedessen wird das Eisen nicht in der üblichen Form gespeichert, sondern als elektronendichte Markierung mitgeführt. In den Zellen des Bindegewebes konnten jedoch Veränderungen an den Myofergranula festgestellt werden, die auf eine Zerlegung schließen lassen. Hier soll zunächst nur über die Verarbeitung von Myofer in der Dünndarmepithelzelle berichtet werden.

### Material und Methodik

Mäusen wurde durch eine Schlundsonde 0,2 cm<sup>3</sup> einer im Verhältnis 1:1 mit Leitungswasser verdünnten Myoferlösung verabreicht. Nach 30 min wurden Anteile des vorderen Dünndarmabschnittes in gepuffertem OsO<sub>4</sub> fixiert, in Plexiglas eingebettet, ultradünn geschnitten und im Siemens Elmiskop I mikroskopiert. Lichtmikroskopische Kontrollen wurden mit der Berliner Blau-Reaktion vorgenommen.

### Befunde

Die Aufnahme von Myofer in die Darmepithelzelle erfolgt vorwiegend durch Permeation des Plasmalemmes oder einen vergleichbaren Vorgang, nur zu geringem Teil anscheinend auch durch Pinozytose. Nach Eindringen in die Mikrovilli wird Myofer innerhalb dieser Zytoplasmafortsätze in basaler Richtung weitergeleitet, wie die Verdichtung der in den Mikrovilli längsverlaufenden Binnenstrukturen vermuten läßt, und dann in kleinen unter der „dichten Zytoplasmazone“ gelegenen Bläschen angereichert (Abb. 1, 3). Die Herkunft der Bläschen ist bei den verschiedenen Zelltypen nicht einheitlich. In der Darmepithelzelle

entstehen sie teilweise durch Abschnüren aus dem endoplasmatischen Retikulum oder durch Plasmalemmvesikulation (Abb. 3). Während des intrazellulären Transportes konfluieren sie im oberen Drittel des Zelleibes, wodurch ihr Inhalt zu größeren Aggregaten zusammengefaßt wird (Abb. 2, 3). Ein Teil der Myofer-

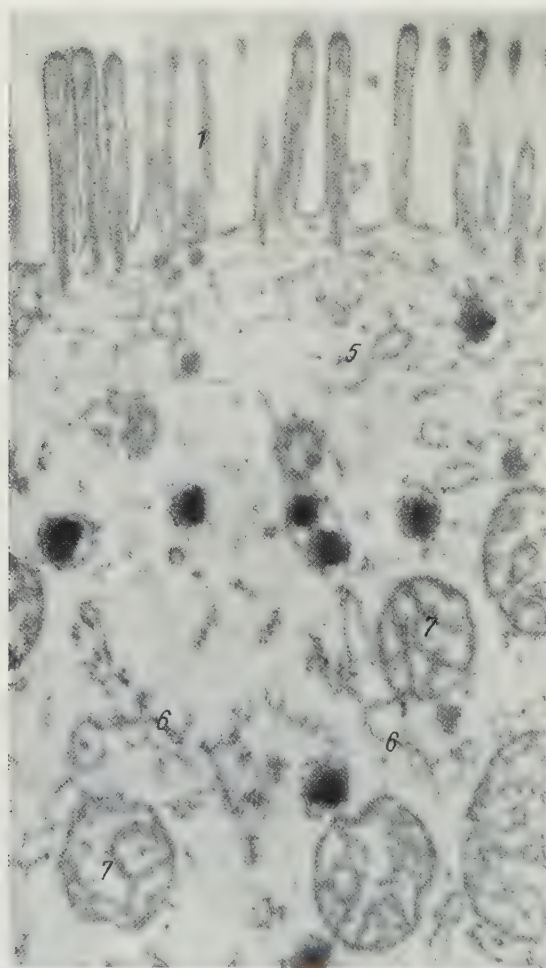


Abb. 1. Dünndarmepithelzelle der Maus; Zellapex. Vakuoläre Anreicherung von Myofer. 1 Mikrovilli; 5 leere Vakuolen; 6 endoplasmatisches Retikulum; 7 Mitochondrien. Vergr. 40000fach

aggregate passiert den supranukleären Zellbereich, ohne mit den Golgi-Strukturen in näheren Kontakt zu gelangen, andere werden durch das längsorientierte Strukturgefüge direkt in den Bereich der Golgi-Lamellen geleitet. Gleichzeitig erfolgt eine Anreicherung in Vakuolen, die an den Enden der Lamellenpakete des Golgi-Apparates (DALTON-Komplex) abgeschnürt werden. Die hier gebildeten Granula sind meist eigenartig deformiert. Einlagerungen von Myofer in das endoplasmatische Retikulum ließen sich in keinem Fall nachweisen. Oberhalb und in Höhe des Zellkernes werden die Myofergranula in den Interzellularraum abgegeben (Abb. 3), indem sich die Vakuole der seitlichen Zellwand anlegt, an dieser Stelle aufbricht und indem ihre Membran in das Plasmalemm einbezogen wird. Die Interzellularräume sind in Höhe des mittleren und unteren Zelldrittels mit Myofergranula dicht gefüllt. An der Zellbasis werden nur vereinzelt Granula abgegeben. Den gleichen Weg

konnten PALAY und KARLIN (1959) für Lipide in der Dünndarmepithelzelle nachweisen.

Vergleicht man die Ergebnisse nach Myoferapplikation mit den Befunden nach Vitalfärbung mit Trypanblau, Neutralrot oder Acridinorange an verschiedenen Zelltypen, so gelangt man zu folgender Vorstellung über den intrazellulären Stofftransport: Stoffe, die durch das Plasmalemm eindringen können, werden nach diffuser Verteilung im Zytoplasma in Vakuolen angereichert. Diese können durch Plasmalemmvesikulation bei der Pinocytose (LEWIS 1931, BENNETT 1956,



HOLTER 1959, STAUBESAND 1960), aus dem endoplasmatischen Retikulum oder aus dem Golgi-Apparat entstehen (SCHMIDT 1961). Bei den verschiedenen Zelltypen scheint der eine oder der andere Bildungsmodus vorzuherrschen. In Am-

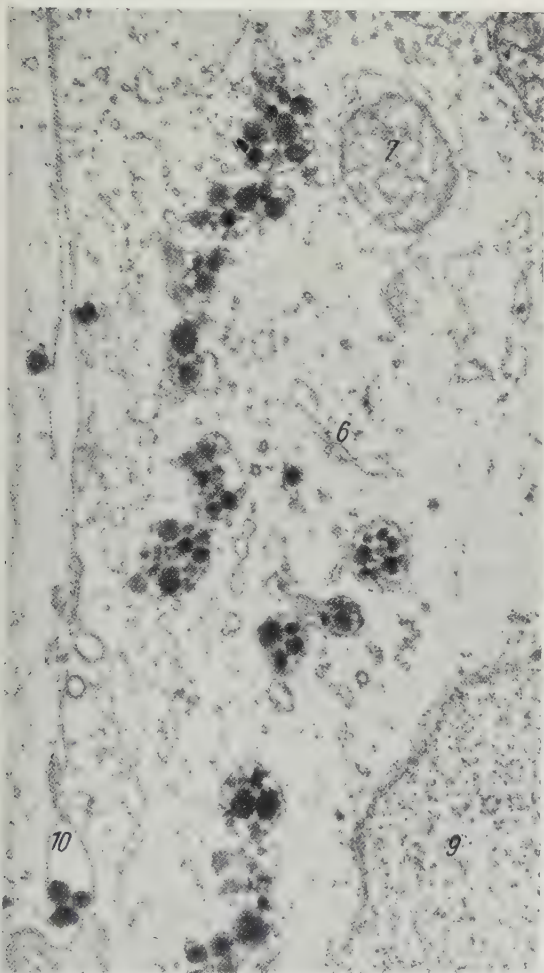


Abb. 2

Abb. 2. Ausschnitt aus einer Darmepithelzelle desselben Versuchstieres wie in Abb. 1, jedoch in Höhe des Zellkernes (9). 6 endoplasmatisches Retikulum; 7 Mitochondrium; 10 Interzellularraum mit Myofergranula. Vergr. 25 000fach

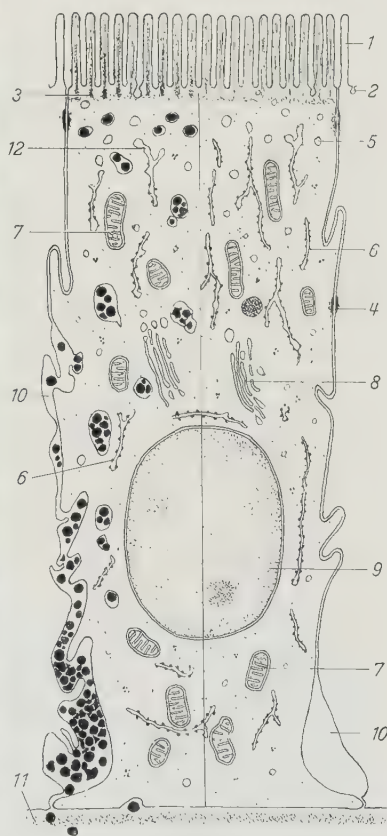


Abb. 3

Abb. 3. Schema des Feinbaues einer Dünndarmepithelzelle in Anlehnung an ZETTERQUIST (1956). Auf der rechten Bildhälfte wurde der „normale“ Zustand dargestellt; auf der linken nach Resorption von Myofer. 1 Mikrovilli; 2 pinozytotische Einsenkungen des Plasmalemmas; 3 „dichte Zytoplasmazone“; 4 Haftplatten; 5 Vakuolen; 6 endoplasmatisches Retikulum; 7 Mitochondrien; 8 Golgi-Apparat; 9 Zellkern; 10 Interzellularraum; 11 Basalmembran

nionepithelzellen konnte eine Speicherung von Myofer auch in Mitochondrien beobachtet werden. Die Gesamtheit der Vakuolen, die zur Stoffaufnahme, Anreicherung und Speicherung befähigt sind und im normalen Stoffwechsel offenbar gleiche Funktionen erfüllen, fasse ich in Anlehnung an PARAT (1928) unter der Bezeichnung „vakuolärer Apparat“ zusammen. In ihm erfolgt der Transport

von der resorbierenden Oberfläche der Zelle bis zur Stelle der Abgabe. Bei der herkömmlichen lichtmikroskopischen Darstellung des Golgi-Apparates durch Osmieren (KOPSCHE-KOLATSCHEW) wird dieser „vakuoläre Apparat“ zum Großteil mit erfaßt und geht mit den Lamellenpaketen des elektronenmikroskopisch definierten Golgi-Apparates (DALTON-Komplex) in das Bild des Netzapparates ein.

### Literatur

- BENNETT, H.: The concepts of membrane flow and membrane vesiculation as mechanisms for active transport and ion pumping. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 99—103 (1956).
- DALTON, A. J.: A study of the Golgi material of hepatic and intestinal epithelial cells with the electron microscope. *Z. Zellforsch.* **36**, 522—540 (1952).
- HOLTER, H.: Pinocytosis. *Int. Rev. Cytol.* **8**, 481—504 (1959).
- LEWIS, W. H.: Pinocytosis. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **49**, 17—27 (1931).
- PALAY, S. L., and L. J. KARLIN: An electron microscopic study of the intestinal villus. II. The pathway of fat absorption. *J. biophys. biochem. Cytol.* **5**, 373—383 (1959).
- PARAT, M.: Contribution à l'étude morphologique et physiologique du cytoplasme, chondriome, vacuome (appareil de Golgi), enclaves etc. *Arch. Anat. micr.* **24**, 73—357 (1928).
- SCHMIDT, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung von Trypanblau in den Zellen des Hauptstücks der Niere. *Z. Zellforsch.* **52**, 598—603 (1960).
- Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die intrazelluläre Verarbeitung von Vitalfarbstoffen. *Habil.-Schr. Hamburg* 1961.
- STAUBESAND, J.: Experimentelle elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Phänomen der Membranvesikulation (Pinocytose). *Klin. Wschr.* **38**, 1248 (1960).
- ZETTERQUIST, H.: The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. *Karolinska Institutet Stockholm* 1956.

Dr. med. W. SCHMIDT,  
Anatomisches Institut, Univ.-Krankenhaus,  
Hamburg 20, Martinistraße 52

Aus dem Anatomischen Institut\* der Universität Marburg a. d. Lahn  
(Direktor: Prof. Dr. K. NIESSING)

MORPHOLOGISCHE UND EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN  
AN DER ALLANTOIS DES HÜHNCHENS\*\* \*\*\*

Von  
W. KÜHNEL

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. April 1961)

Inhalt	Seite
A. Einleitung . . . . .	807
B. Material und Methodik . . . . .	808
C. Bemerkungen zur Entwicklung und Topographie . . . . .	808
D. Befunde . . . . .	809
I. Das Epithel der Allantois . . . . .	809
II. Das Bindegewebe der Allantois . . . . .	812
1. Die Anordnung des Fasergerüsts S. 814. — 2. Die Blutgefäße S. 816. —	
3. Die Bindegewebszellen S. 818.	
III. Operative Eingriffe an der Allantois . . . . .	820
E. Diskussion . . . . .	824
Zusammenfassung . . . . .	828
Literatur . . . . .	829

A. Einleitung

Vergleichende Untersuchungen an der Allantois wurden von PETRY (1959, 1961) durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll hier über den Bau der Allantois des Hühnchens berichtet werden.

In entwicklungsgeschichtlichen Lehrbüchern wird der Allantois des Hühnchens und der Allantois im allgemeinen bezüglich der vergleichenden Gesichtspunkte und ihrer formalen Entstehungsweisen ein großer Raum gegeben. Hinsichtlich ihres Baues fehlen jedoch nähere Angaben. Es ist davon die Rede, daß der Dottersack an Bedeutung verliert und daß die Allantois immer größer wird, bis sie nach der Trennung des Amnions vom Chorion den gesamten Raum des extraembryonalen Cöloms ausfüllt. Es wird berichtet, daß die Allantois mit Hilfe ihrer Gefäße, ebenso wie der Dottersack, zu einem Organ der Ernährung wird, das sich bei seiner Ausbreitung dem Chorion von innen her anlegt. Es liegen jedoch keine Untersuchungen über die genaueren zytologischen Verhältnisse an der Hühnchen-Allantois vor.

Diese Hinweise auf die Bedeutung der Allantois als Ernährungs- und Atmungsorgan veranlaßten, nach morphologisch faßbaren Beweisen dieser Funktion zu suchen. Dazu war es erforderlich, zunächst die Topographie und dann die weiteren morphologischen Merkmale herauszustellen, wobei sowohl das bindegewebige Gerüst mit den eingelagerten Gefäßen, als auch das Epithel und die Bindegewebszellen zu berücksichtigen waren.

\* Aus dem Laboratorium des a. o. Lehrstuhles für Anatomie (Prof. Dr. G. PETRY).  
\*\* Herrn Prof. Dr. med. et phil. H. BECHER zum 65. Geburtstag gewidmet.  
\*\*\* Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.



Die Eigenschaften der betreffenden Gewebspartien werden erst aus der Material- und Strukturanalyse verständlich. Die Allantois des Hühnchens bildet gleichzeitig eine dritte Hülle für den Embryo. Ihr Wachstum in der Fläche verlangt, daß man ihr konstruktives Gefüge nicht im Querschnitt, sondern in der Fläche zu suchen hat.

## B. Material und Methodik

Untersucht wurden bebrütete Hühnereier vom 5.—19. Tag. Das Ei wurde an der Luftkammer mit einer Präpariernadel vorsichtig perforiert, um ein Anhaften an der Schalenhaut und eine Verletzung der Eihüllen bei der anschließenden breiten Eröffnung zu verhindern. Sodann wurden 5—8 cm<sup>3</sup> Fixierungsflüssigkeit unter den Dottersack oder direkt in die Allantoisblase appliziert, wobei eine entsprechende Menge von Eiweiß ausfloß. Das so vorbereitete Ei wurde in die jeweils vorgesehene Fixierungsflüssigkeit gelegt, deren Flüssigkeitsspiegel etwa 2—3 cm das Objekt bedeckte. Nach der Fixierung ließ sich die gesamte Anlage (Dottersack, Embryo im Amnion und Allantois) ohne die geringste Verletzung vom Dotter und Eiweiß trennen. Diese Manipulation wurde unter Wasser ausgeführt. Jetzt ließ sich die Allantoisblase ohne Verletzung des zarten Amnions mit einer feinen Schere am Stiel abschneiden. Die Allantoisblase wurde an ihrem freien Rande aufgeschnitten. Die so gewonnenen Häutchen wurden nach der Methode PETRYs (1956) auf kleine konisch ineinander passende Glasringe (Durchmesser 0,25—2,0 cm) aufgespannt. Die zarten Häutchen werden bei diesem Verfahren unter Wasser oder in einer Fixierungsflüssigkeit über den kleineren Ring gebracht. Dann wird der große Ring über den kleineren gelegt und unter leichtem Druck über den kleineren geschoben. Dabei spannt sich das Häutchen. In diesen Ringen wurden die Häutchen gefärbt und über Terpeneol bis zum Xylol hochgeführt ohne daß man sie zu berühren braucht. Ein sauberes Arbeiten in den sehr empfindlichen Farblösungen war dadurch gegeben. Erst im Xylol werden die Präparate aus den Ringen herausgeschnitten. Das Eindecken der so gewonnenen runden, scheibenförmigen Objekte war denkbar einfach, da keinerlei Spannungen aufgetreten waren. Auch zur Gewinnung exakter Flachschnitte bewährten sich diese Ringe, aus denen die Häutchen nach Erkalten des Paraffins als schneidfähiger, zylindrischer Block herausgeschnitten wurden. Als Einbettungsmittel wurde Paraffin, als Intermedium stets Zedernholzöl benutzt. Von jedem Objekt wurden Quer-, Schräg- und Flachschnitte angefertigt, wobei die Schnittdicke innerhalb jeder Serie verändert wurde. Sie betrug 5, 8, 10, 15 und 20  $\mu$ .

*Fixierungsmittel.* Neutrales Formol (1:9), Bouinsches Gemisch, Carnoy, Roßmann, Flemming.

*Färbungen.* van Gieson, Hämatoxylin-Eosin, Heldsches molybdänsaures Hämatoxylin, Eisenhämatoxylin nach M. HEIDENHAIN, Chrom-Alaun-Hämatoxylin-Phloxin nach GOMORI, Azan, Silber-Imprägnationsmethode nach GOMORI (Modifikation nach PETRY), Bleitetracetat-Methode nach SHIMIZU zum Nachweis von Glykogen mit entsprechenden Kontrollen, PAS-Reaktion, Sudan Schwarz B, Methylenblau, Toluidinblau.

Die Mikrophotogramme wurden mit dem Photomikroskop der Fa. Zeiss angefertigt.

*Operative Eingriffe* an der Allantois. Bei etwa 100 Hühnchen wurden folgende Versuche und operative Eingriffe unter sterilen Kautelen vorgenommen:

1. Entfernung der Allantois am Stiel durch Elektrokoagulation mit dem Thermokauter.
2. Stichelung bzw. breite Eröffnung der Allantoisblase mit dem Thermokauter, so daß sich der Inhalt entleerte.
3. Unterbindung des Allantoisstieles mit dünner Seide. Die in der Kalkschale befindlichen Fenster wurden mit Tesa-Film verklebt, die Eier wie üblich weiter bebrütet.

## C. Bemerkungen zur Entwicklung und Topographie

Bei Vögeln ist der gesamte Wasserbedarf dem Ei von Anfang an mitgegeben; auch das zwangsläufig durch die Verdunstung abgehende Wasser ist bereits im Ei enthalten. Somit ist das Ei nur in Hinsicht auf Wärme und Gasaustausch vom Milieu abhängig. Die Lebensvorgänge im eingeschlossenen Keim aber erfordern noch andere Hilfsorgane z. B. für die Aufbewahrung der vom Embryo gebildeten Exkretstoffe. Für die Lagerung der Exkrete im Ei dient die Allantois. Sie hat jedoch sicher noch andere Funktionen.

Beim Hühnchen kann der Dottersackkreislauf nur kurze Zeit den Sauerstoffbedarf des heranwachsenden Embryo decken. GROSSER (1909) meint, daß einerseits die Doppelfunktion des Kreislaufes hinderlich sei, da die Gefäße mit Nährstoffen erfüllt sind. Andererseits ist er der Ansicht, daß die Ausdehnung des Dottersackes nicht besonders groß ist; seine dorsale Seite ist von dem wachsenden Embryo verdeckt und von der Atmosphäre abgeschnitten. Seine Größe nimmt mit dem Verbrauch der Nährstoffe fortwährend ab. So wird die respiratorische und resorptive Funktion von der Allantois übernommen. Das vaskularisierte Allanto-Chorion wird zu einem resorbierenden Organ, welches mit der Schleimhaut des Darmes vergleichbar ist, das Eiweiß verflüssigt und aufnimmt und gleichzeitig auch den Gaswechsel ermöglicht.

Nachdem sich die Allantois über die ganze Chorionhöhle ausgedehnt hat, gewinnt sie enge Beziehungen zur Eiweißschicht und damit zu jener oben erwähnten neuen Nahrungsquelle. Sie nähert sich auch der Eischale und der Luftkammer am stumpfen Eipol und gelangt auf diese Weise immer näher an die eigentliche Sauerstoffquelle. Die Allantoisgefäße

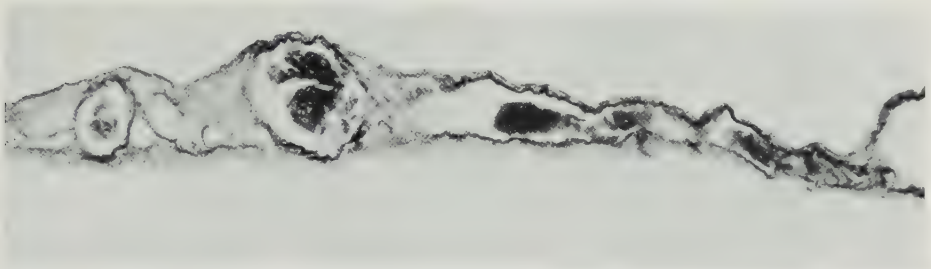


Abb. 1. Übersicht über Allanto-Chorion im Querschnitt. Allantois unten, Chorion oben. 10. Tag. Azan, 140fach

werden damit zum Atmungsorgan des tief im Innern des Eies versenkten Embryos. Die Allantois bildet zwischen dem Chorion einerseits und Amnion und Dottersack andererseits ein drittes Hüllsystem des Embryos. Wie der Dottersack ist sie vom viszeralen Blatt des Mesoderms umhüllt.

Der dem Amnion und Dottersack zugewandte Teil des Mesoderms der Allantois enthält ebenfalls Gefäße. Die Bedeutung der Allantoisblase, welche den Dottersack gleichsam ablöst, beruht auf ihrer Funktion als resorbierendes Ernährungs-, Atmungs- und schließlich als Ausscheidungsorgan. So hat TOMITA (1959) in der Allantoisflüssigkeit eines 9 Tage alten Embryos 1,786 g feste Stoffe gefunden. Der Gesamt-N-Gehalt betrug an diesem Tage 0,06 %, am 14. Bebrütungstage bereits 0,55 %.

#### D. Befunde

Das vaskularisierte Allanto-Chorion wird als Ganzes beschrieben, da Allantois und Chorion vom 5. Tage der Bebrütung ab nicht mehr voneinander zu trennen sind. Zur Orientierung sei den Besprechungen die Abb. 1 vorangestellt, die einen Querschnitt durch das Allanto-Chorion zeigt.

##### I. Das Epithel der Allantois

Innerhalb einer Allantoisblase bietet das Epithel am Flachschnitt und Häutchenpräparat ein verhältnismäßig gleichmäßiges Bild (Abb. 2). Es läßt sich am besten mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN oder mit molybdänsaurem Hämatoxylin nach HELD zur Darstellung bringen. Es handelt sich um große, flach-kubische und nahezu geradlinig begrenzte Zellen, die sich an manchen Stellen unterschiedlich anfärben. Beim Amnionepithel wurde dieses Phänomen schon beschrieben (BAUTZMANN u. SCHRÖDER 1953; PETRY 1956). Gleiche Be-

funde wurden von PETRY (1961) am Allantoisepithel der Katze erhoben. Dunkel und hell gefärbte Zellen wechseln sich ab. Einige Zellen nehmen fast keine Farbe an, zeigen aber auch bei stärkster Vergrößerung deutlich das Bild der Allantoiszelle, so daß sich anfängliche Vermutungen, es handle sich dabei um Stomata, nicht bestätigten. Es ist möglich, daß die hellen und dunklen Zellen verschiedene Funktionsstadien darstellen.

Die Vermehrung erfolgt mitotisch. Obwohl das Material lebensfrisch fixiert wurde, konnten an vielen Totalpräparaten keine Mitosen gefunden werden,

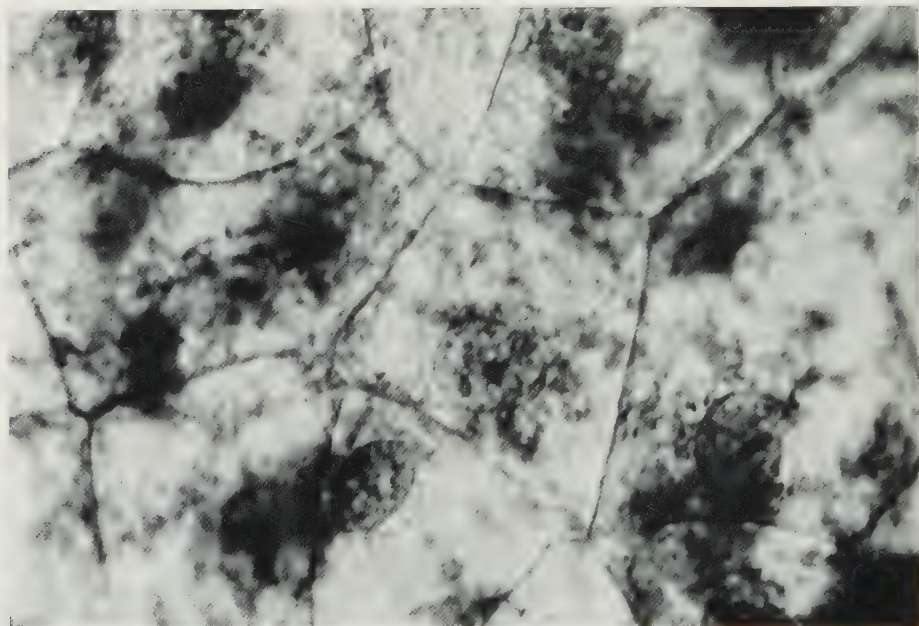


Abb. 2. Allantoisepithel. 9. Bebrütungstag, Totalpräparat. Eisenhämatoxylin, Phasenkontrast, 1700fach

während sie an anderen wiederum in jedem Gesichtsfeld vorlagen. Es ist anzunehmen, daß die Teilungen in einem bestimmten Rhythmus ablaufen, wie dies von PETRY (1961) beim Amnion- und Allantoisepithel der Katze diskutiert wurde.

Die Kerne der Allantoisepithelzellen sind teils kreisrund, teils oval. Gelegentlich erscheinen sie ein wenig ausgebuchtet und gekantet. Das Chromatingerüst ist fein verteilt. Die meisten Kerne enthalten zwei intensiv gefärbte Nukleoli. Zuweilen existieren neben einem großen Nukleolus mehrere grobkörnige Chromatinschollen. Die Zellen sind vorwiegend einkernig, nur gelegentlich sieht man zwei Kerne, die dann aber kleiner sind. Manche Kerne besitzen große, halbmondförmige bis kreisrunde Vakuolen, die zuerst im Bereich der Nukleoli auftreten. Der Nukleolus liegt dann an der Peripherie dieser Vakuole. Diese können so groß werden, daß sie einen erheblichen Teil des Raumes einnehmen und nur noch ein kleiner sichelförmiger Abschnitt des Kernes übrigbleibt, der hell erscheint (Abb. 3). Kerne mit noch kleineren Vakuolen sind meist dunkler, das Chromatingerüst dichter. Es fiel auf, daß die Kerne häufig am Rande der Zelle liegen. An diesen Stellen erscheinen sie chromatinärmer. Andere Kerne wieder



sind an der Kernmembran stark verdickt, während das übrige Kernplasma völlig hell erscheint.

Eine besondere Anordnung der Epithelzellen zeigt die Abb. 4. Fünf bis acht Zellen richten sich rosettenartig auf eine in der Mitte gelegene kleinere Zelle aus. Die Kerne sind dann mehr in die dem Mittelpunkt der Rosette näher liegenden Zellabschnitte verlagert, wodurch das rosettenartige Bild noch deutlicher hervortritt. Das Zytoplasma enthält in Kernnähe feinste Granula, die sich am besten mit Chrom-Alaun-Hämatoxylin-Phloxin nach GOMORI zur Darstellung bringen lassen. Das Zytoplasma der Allantoisepithelzellen besitzt zum Teil eine stark schaumige Struktur (Abb. 5). In der Nähe der Kerne und oft unter Berührung mit den Kernen selbst, werden vereinzelte, besonders große Vakuolen angetroffen, die schon bei geringer Lupenvergrößerung sichtbar werden. Größere Vakuolen entstehen offensichtlich durch Vereinigung mehrerer kleinerer. Meistens aber sieht man Komplexe nebeneinanderliegender Vakuolen, deren Zwischenwände noch vorhanden sind. Diese Zellen haben eine wabenartige Struktur. Es ist möglich, daß sich diese Gebilde zu einer großen Blase umwandeln können, sobald die Zwischenwände aufgelöst werden. Wie so viele der morphologischen Eigenarten der Eihäute fallen die Vakuolen und Zellstrukturen im Querschnittsbild gar nicht oder nur wenig auf, während im Häutchenpräparat oder im Flachschnitt das Bild von ihnen bestimmt wird. Im Falle großer Vakuolen werden die Kerne wie bei einer Fettzelle an die Peripherie gedrängt, wo sie kappenartig der Zelle aufsitzen. Sie sehen bei unseren Fixierungen stets heller aus als das Zytoplasma.

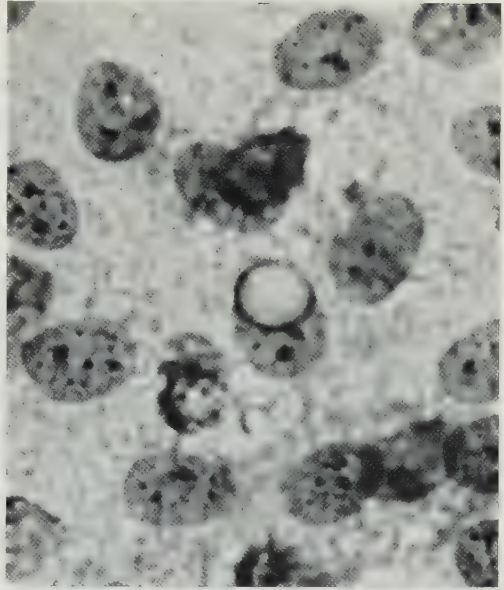


Abb. 3. Allantoisepithel mit Kernvakuolen. 8. Bebrütungstag, Flachschnitt. Eisenhämatoxylin, 1400fach (s. Text)

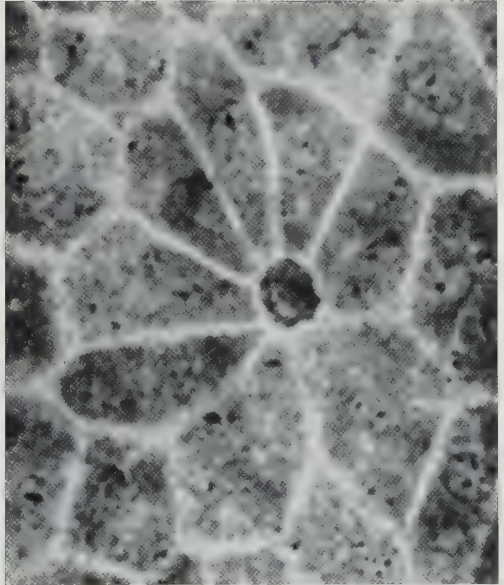


Abb. 4. Rosettenartige Anordnung von Epithelzellen der Allantois. In der Mitte eine kleine Zelle (vgl. BAUTZMANN 1956 über „Hofbauer-Zellen“). Fokussierung auf Zellgrenzen, daher Kerne undeutlich. Flachschnitt, Chrom-Hämatoxylin-Phloxin nach GOMORI, 880fach

Es gelang nicht, den Vakuoleninhalt anzufärben. Es lag nahe anzunehmen, daß die Vakuolen ähnlich wie beim Amnion des Menschen Fett enthalten, zumal die Allantois Ernährungs- und Ausscheidungsorgan des jungen Keimlings ist. Fettreaktionen haben diese Annahme jedoch nicht bestätigt. Mit Sudan-Schwarz B wurden nur vereinzelte Granula dargestellt. Auch Glykogen konnte in der Allantois des Hühnchens nicht nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den Befunden an der Allantois der Katze, des Schafes und des Schweines (PETRY 1959).

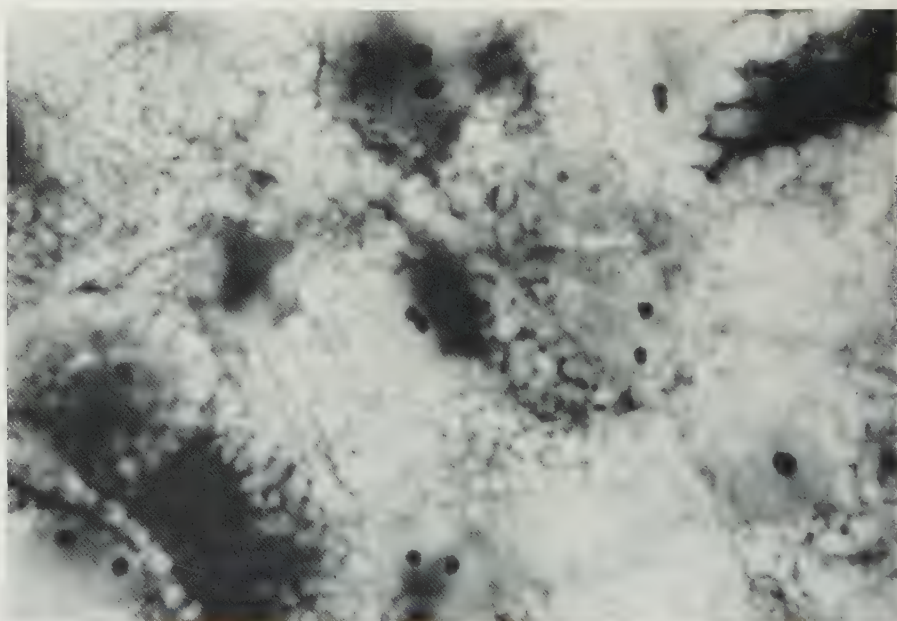


Abb. 5. Basal liegende Vakuolen des Allantoisepithels. Kerne, Zellgrenzen und Vakuolen in verschiedenen Ebenen. Fokussierung auf die Vakuolen. Häutchenpräparat Allanto-Chorion, 13. Bebrütungstag. Chrom-Hämatoxylin-Phloxin nach GOMORI, 1400fach

## II. Das Bindegewebe der Allantois

Das Bindegewebe der Allantois läßt sich durch drei Elemente charakterisieren: 1. den Formationen argyrophiler Fasern, 2. das sich hier ausbreitende Gefäßnetz und 3. den spezifischen Zellformen. Alle Anteile sind nur von der Fläche her zu erfassen, da aus Schnittpräparaten (s. Abb. 1) senkrecht zur Oberfläche ihre Struktur und Anordnung nicht ersichtlich sind. Dabei lassen sich Allanto-Chorion und jenes Gebiet der Allantois, das dem Amnion aufliegt, also keinerlei Beziehungen zum Chorion hat, durch die Art der Anordnung dieser Elemente unterscheiden. Muskelzellen, die sich in dem Teil der Allantois entwickeln sollen, der dem Amnion anliegt, konnten nicht nachgewiesen werden. Allerdings verwächst die Allantois in einem kleinen Streifen am Allantoisstiel mit dem Amnion. Es ist durchaus möglich, daß in dieser kleinen Zone Muskelzellen vorkommen, die dann aber sicher vom Amnion stammen müßten. Es läßt sich auch kein Grund für das Vorkommen solcher Muskelzellen aufzeigen — im Gegensatz zum Amnion —, da die Allantois kein Organ ist, das sich kontrahiert



oder Schaukelbewegungen (BAUTZMANN 1953) ausführt. Wie bereits angedeutet, läßt sich die Allantois vom Chorion nicht abpräparieren. Der Grund liegt in der

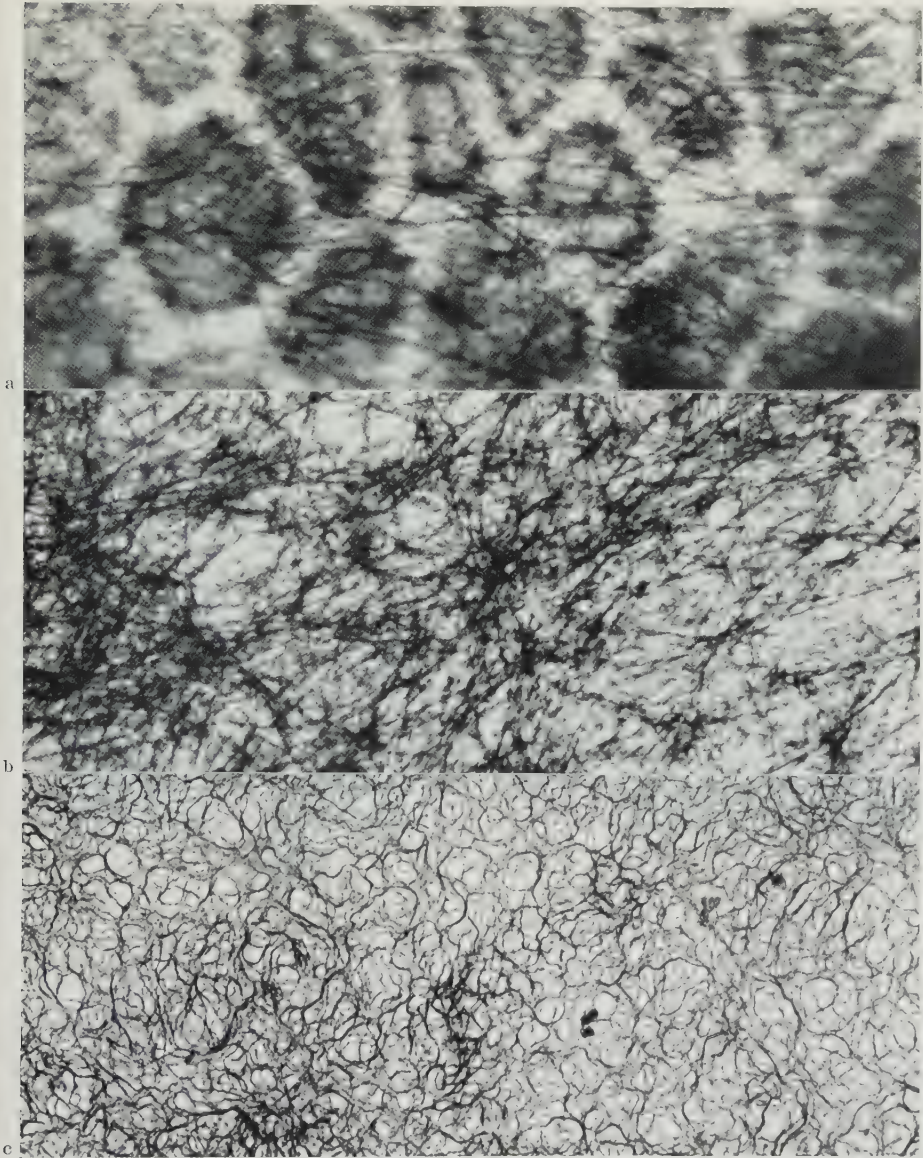


Abb. 6a—c. Subepitheliales Bindegewebsgerüst. Totalpräparat Allanto-Chorion, Versilberung nach GOMORI. a Fasergerüst unmittelbar an der Epithelbasis, 1400fach. b Faserschicht unter a, 560fach. c Fasernetz in der Mitte des Allanto-Chorion, in dem die Blutgefäße eingebaut sind. 290fach, vgl. auch Abb. 9a

Art und Weise, wie sich das von der Allantois stammende Gefäßnetz im Chorion aufzweigt.

Die Textur des Allantoisbindegewebes ist typisch für eine flächenhaft orientierte Membran. Vom Beginn ihrer Entwicklung an steht die Allantois bis zum



Schlüpfen des jungen Hühnchens unter dem Druck ihres Inhaltes. Die Allantoisblase ist dehnbar; elastische Fasern kommen jedoch nicht vor. Die Dehnbarkeit ist durch die Umordnung des Bindegewebsgerüstes denkbar.

Die Architektur der Allantois ist in allen ihren Teilen gleich. Kleine Abweichungen kommen innerhalb der einzelnen Strukturen — vor allem in jenem Teil, der dem Amnion zugewandt ist — vor. So gelingt es auch an Hand der dargestellten Schichten die Allantois zu erkennen und ihre Strukturen von denen des Dottersackes, des Amnions und des Chorions zu unterscheiden.

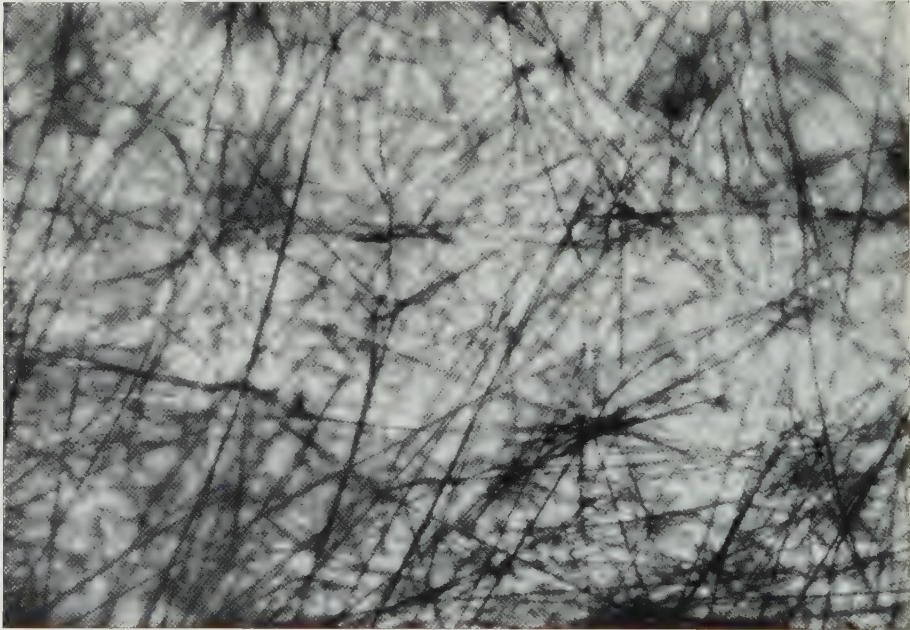


Abb. 7. Subepitheliales Bindegewebsgerüst aus der freien Allantois (s. Text). Totalpräparat, Allantois. Versilberung nach GOMORI, 560fach

**1. Die Anordnung des Fasergerüstes.** Die Gitterfasern (Abb. 6a) verteilen sich wie bei allen membranartigen Epithelbindegewebsgrenzen zu dichten, flächenhaft ausgebreiteten Netzen.

Nach PETRY (1961) sollte jedes neue Objekt auf die spezifische Anordnung des Fasergerüstes erneut untersucht werden, da bei einzelnen Spezies (z. B. Ratte, nach neueren Untersuchungen beim Meerschweinchen) besondere Formationen auftreten können, die sich nicht in das allgemeine Schema einfügen lassen.

An Häutenpräparaten oder flachen Schrägschnitten erhält man den besten Überblick über die Zusammenhänge des Allantoisepithels und den darunter folgenden Bindegewebschichten. Das subepitheliale Bindegewebe beginnt mit einer aus feinsten Gitterfasern bestehenden basalen Schicht (Abb. 6a u. b). Je weiter sie sich davon entfernen, um so größer wird der Querschnitt der Fasern und um so grobmaschiger das Netz, das sie bilden (Abb. 6c). In ihm sind die großen Gefäße eingebaut. Über ihnen ist das Netzwerk besonders kräftig entwickelt und engmaschig (s. Abb. 9a). Es handelt sich um isolierte oder zu Bündern zusammengefaßte doppelbrechende kollagene Fasern. Die von ihnen gebildeten Netze sind verschieden dicht, besonders über den großen Gefäßen.

Der Durchmesser der Fasern ist unterschiedlich. Sie hängen durch Verzweigungen untereinander zusammen. Die kräftigsten von ihnen ziehen in gewellten Linien durch das Blickfeld (Abb. 6c), oft zusammen in größeren Bündeln. Sie verzweigen sich auf verschiedene Weise, stumpf- oder spitzwinklig. An Stellen, wo tiefer gelegene Maschenräume von höher gelegenen überlagert werden, entstehen Kreise, Ovale, Spitzbogen in verschiedenen Größen, ähnlich wie es BAUTZMANN und SCHRÖDER (1953) am Hühnchen-Amnion und PETRY (1956) am menschlichen Amnion und Chorion beschrieben haben. In frühen Entwicklungs-

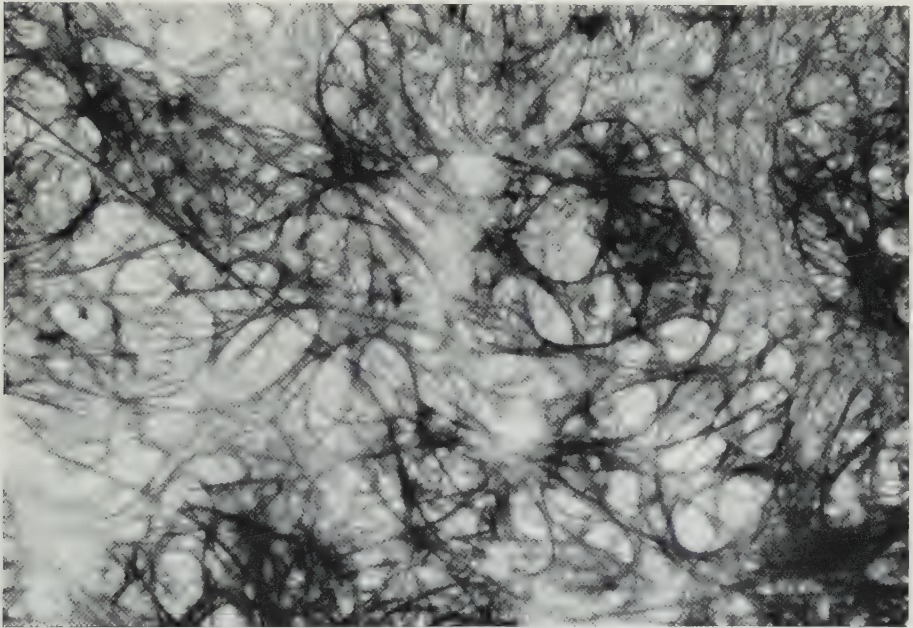


Abb. 8. Tiefes Bindegewebsgerüst aus der freien Allantois. Totalpräparat Allantois, 10. Bebrütungstag. Versilberung nach GOMORI, 720fach

stadien sind die Netze sehr fein. Vom 12. Tage der Bebrütung ab war dieses Maschenwerk dem des 18. Tages völlig gleich. Vielleicht waren die Fibrillen noch nicht ganz so massiv, die einzelnen Maschenräume noch nicht so weit. Die Tatsache, daß sich die Fasern mit der Silberimprägnationsmethode darstellen lassen berechtigt noch nicht, sie als argyrophile Fasern anzusprechen. Es konnte festgestellt werden, daß ein Teil der in Abb. 6c durch Versilberung dargestellten Fasern doppelbrechend sind, der andere jedoch nicht.

Das freie Allantoisgebiet (jene Teile, die dem Amnion aufliegen) zeigt eine etwas andere Bindegewebsarchitektur. Unter dem Epithel breitet sich auch hier das bereits weiter oben beschriebene subepitheliale feine Gitterfasernetz aus. Unmittelbar darunter aber folgt eine Schicht, wie es die Abb. 7 zeigt und die der Lage der in Abb. 6b gezeigten Fasern entspricht. Von einzelnen Knotenpunkten scheinen büschelförmig oder pinselartig lange dünne Fasern auszugehen. Ein ähnliches Gerüst hat PETRY (1955) in der Zwischenschicht der menschlichen Eihäute beschrieben. Auch dort kann man lange, gerade verlaufende Fasern verfolgen, die sich sternförmig verzweigen. PETRY bezeichnet diese



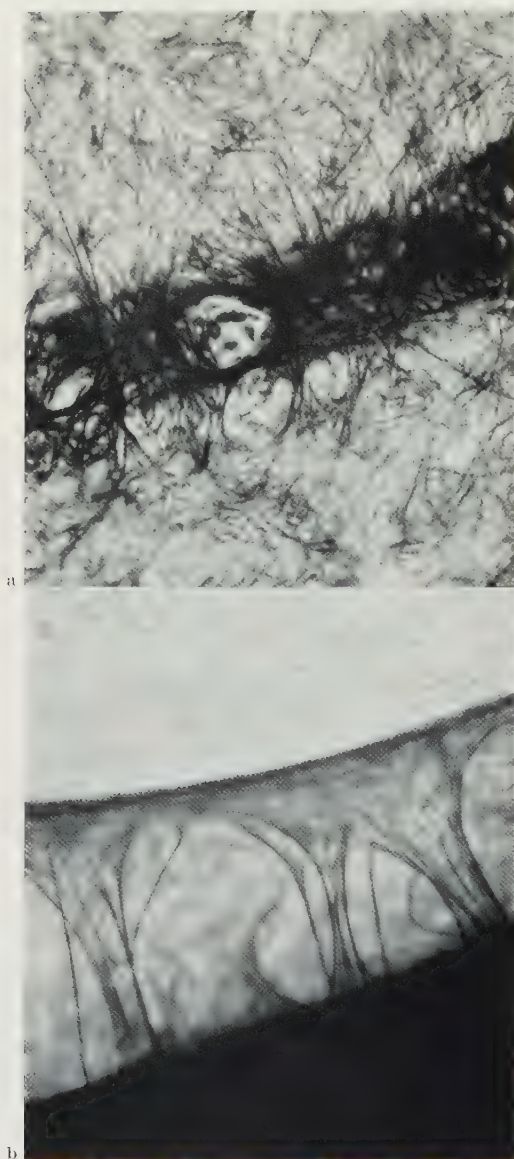


Abb. 9 a u. b. Verankerung der Allantoisblutgefäße im Bindegewebsgerüst. a Bindegewebsverdichtung über einem kleinen Blutgefäß und dessen Verankerung. Totalpräparat Allanto-Chorion, 9. Bebrütungstag. Versilberung nach GOMORI, 230fach. b Adventitielle Verankerung eines großen Gefäßes. Teil der Gefäßwand im Bild unten (schwarz). Totalpräparat Allanto-Chorion, 10. Bebrütungstag. Versilberung nach GOMORI, 560fach

Knotenpunkte, in denen sich diese Fasern treffen oder von denen sie ausgehen, als „Kristallisationszentren“. Aus der Abb. 7 ist ferner zu entnehmen, daß die Fasern sich durch Aufzweigungen verfeinern. Das folgende grobe Netzwerk (Abb. 8) bildet hier jedoch größere Verdichtungen in seinen Maschen als im Allanto-Chorion (vgl. Abb. 6c). Die einzelnen Fasern legen sich zu breiten Bändern zusammen und bilden ein abgerundetes Maschenwerk. Der Eindruck einer fast lückenlosen Bindegewebsmembran wird hier im Gegensatz zu Abb. 6c besonders deutlich.

Die Festigkeit der Allantois ist nicht so groß wie die des Amnions. Zwar kann man bei Injektion der Allantoisblase eine zusätzliche Erweiterung erreichen, eine so auffallende Dehnbarkeit wie sie z. B. das menschliche Amnion besitzt, liegt jedoch nicht vor. Solange die Allantois noch nicht mit dem Chorion verwachsen ist, wird eine größere Dehnbarkeit beobachtet. Mit der starken Vaskularisierung des Allanto-Chorions sinkt die Festigkeit des Gewebes so weit ab, daß es schon bei geringster mechanischer Beeinflussung, wie z. B. schon durch Berührung beim Eröffnen der Eischale, reißt.

**2. Die Blutgefäße.** Bereits bei Lupenvergrößerung kann das Gefäßsystem der Allantois in zwei unterschiedliche Gebiete aufgeteilt werden. Einem weitmaschigen Gefäßnetz der Allantois steht ein außerordentlich stark kapillari-

siertes Netz im Allanto-Chorion gegenüber, ein Verhalten, das bei allen bisher untersuchten, mit einer Allantois ausgestatteten Spezies beobachtet werden kann (PETRY 1959). Das dem Amnion anliegende Allantoisgebiet entwickelt



kein ausgesprochenes Kapillarnetz. Es kann nicht eindeutig beantwortet werden, welche funktionelle Bedeutung bei der Resorption von Stoffen jenem Gebiet zukommt.

Das dichte Netzwerk argyrophiler Fasern über diesen Blutgefäßen (Abb. 9a) sendet seine feinsten Einheiten in abnehmender Dicke und Dichte in die Umgebung. Die von den großen Gefäßen abgehenden Kapillaren werden von feinfaserigen Netzen umhüllt. Die Gefäße sind durch ein adventitielles Gitterfasernetz an den groben Maschen fixiert. Von den Rändern der Gefäße sieht man

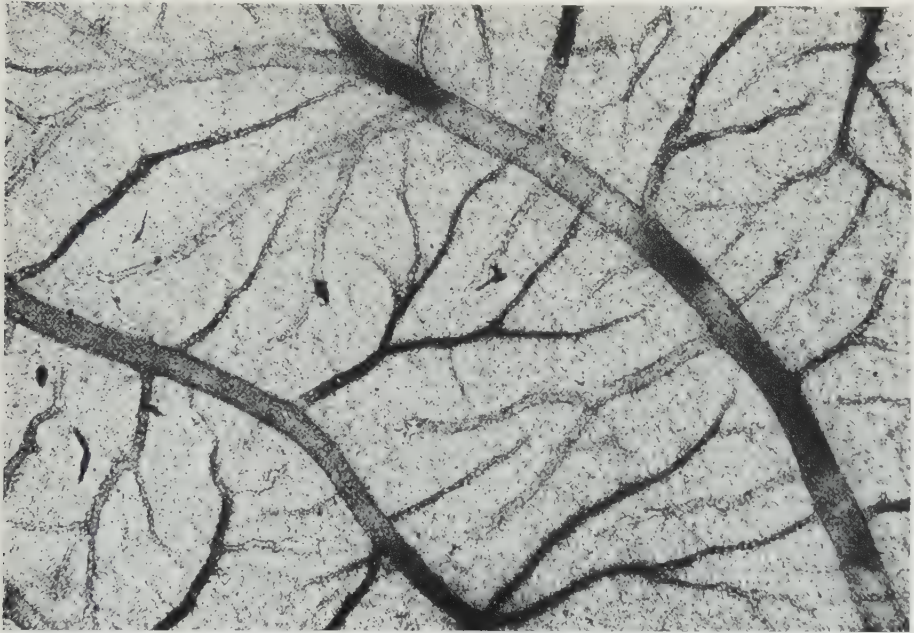


Abb. 10. Übersicht über den Gefäßbaum des Allanto-Chorion. Kapillaren nicht sichtbar (vgl. Abb. 11). Totalpräparat Allanto-Chorion, 8. Bebrütungstag. Versilberung nach GOMORI, 35fach

stärkere Bindegewebsstränge abgehen, die sich im groben Netz verzweigen, oder sie verbinden sich arkadenförmig untereinander und kehren im Bogen wieder zum gleichen Gefäß zurück, wie es die Abb. 9b zeigt. Über den Gefäßen ist das Faserwerk besonders kräftig entwickelt. Benachbarte größere Gefäße werden durch gerade oder bogenförmig verlaufende Faserzüge miteinander verbunden. An größeren Verzweigungsstellen laufen die Gitterfasern quer über die Gefäße hinweg und strahlen in die Umgebung ein.

Im Allanto-Chorion ändert sich die Architektur des Blutgefäßsystems grundlegend. Große Gefäßstämme (Abb. 10) ergießen sich in ein außerordentlich dichtes, aus zahllosen feinsten Kapillaren bestehendes engmaschiges Netz (Abb. 11). Die Kaliber der Kapillaren sind ungleichmäßig. Sinusoide Strecken wechseln sich mit ganz dünnkalibrigen ab, durch die sich die Blutkörperchen nur nach extremer Verformung hindurchzwängen können. Offensichtlich können einzelne Kapillargebiete unterschiedlich durchblutet werden. Ein dichtes Netz von feinen Gitterfasern umspinnt die Kapillaren und verbindet sie untereinander. Die unter dem Chorionepithel ausgebreitete dichte Kapillarfläche kann

mit der stark kapillarisierten Organe, wie z. B. Lunge und Leber, verglichen werden. Fast lückenlos wird das Chorionepithel von der Kapillarfläche bedeckt (Abb. 11). Zwischen Chorionepithel und dem innen eng anliegenden Kapillarnetz bleibt kaum Platz für das Chorionbindegewebe, dessen Zellen vorwiegend in die Kapillarlücken verlagert werden. Die Kapillärwände legen sich unmittelbar dem Chorionepithel an. Auf diese Weise wird seiner Funktion als Atmungsorgan Rechnung getragen.

**3. Die Bindegewebszellen.** In frühesten Entwicklungsstadien etwa bis zum 7. Tage überwiegen die verzweigten embryonalen Formen der Bindegewebs-

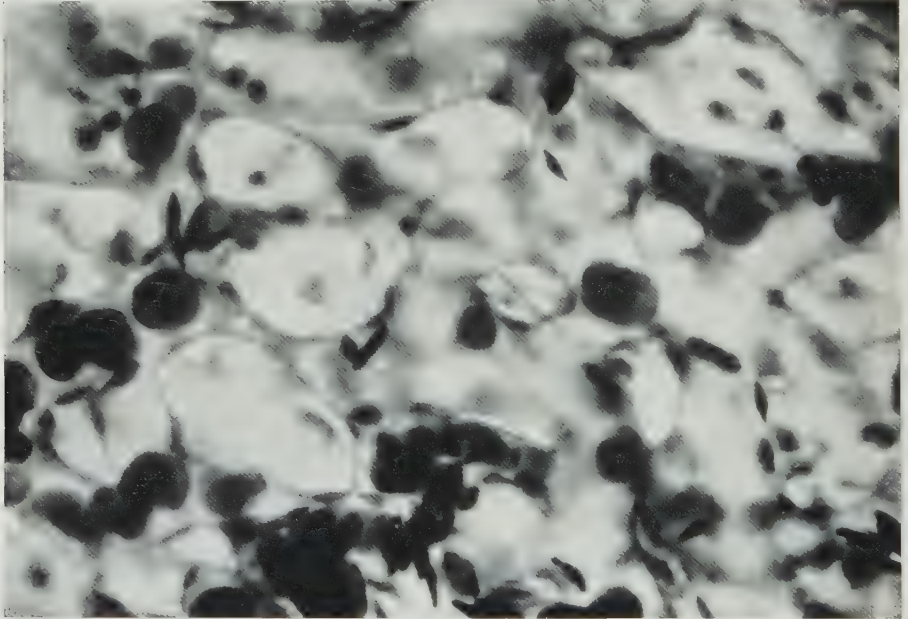


Abb. 11. Dichtes sinusoides Kapillarnetz des Allanto-Chorion. In den Lücken im Untergrund Chorionepithel, Fokussierung auf die Kapillaren. Totalpräparat Allanto-Chorion, 12. Tag. Chrom-Hämatoxylin-Phloxin nach GOMRI, 560fach

zellen, zu späteren Bebrütungsstadien werden mehr ausgereifte Formen der Fibrozyten und Histiozyten angetroffen. Die unter dem Allantoisepithel liegenden Fibrozyten sind flächenhaft orientiert. Ihr Verband ist jedoch nicht so dicht, wie es an den Eihäuten anderer Spezies beschrieben wurde. Bei diesen (z. B. Katze, PETRY 1961; Ratte, PETRY u. ZULEGER 1959) findet man je nach Dichte der Fibrozyten weit- oder engmaschige Netze. Der größte Teil der Zellen des Allantoisbindegewebes ist an das Fasergerüst oder an das Begleitbindegewebe der Blutgefäße gebunden. In den Zwischenräumen treten verschiedene Formen von freien Zellen auf.

Die Darstellung der Fibrozyten und ihrer Fortsätze gelingt am besten mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN. Im Schnittpräparat erscheinen sie als dünne spindelförmige Elemente, die sich den Bindegewebsfasern anschmiegen. Der Formenreichtum jedoch läßt sich wiederum am besten an Häutchenpräparaten studieren. Es handelt sich um langgestreckte, abgeflachte, mit membran-

artigen oder spindelförmigen Fortsätzen versehene Zellen. Ihre großen, meist ovalen Kerne zeichnen sich durch ein zartes Chromatingerüst und einen dunklen Nukleolus aus.

Die vorliegenden Totalpräparate lassen einen synzytialen Zusammenhang dieser Zellen erkennen (Abb. 12), die mit feinsten Fortsätzen untereinander zusammenhängen. Membranartige Ausläufer, die den Eindruck eines plasmatischen Kontinuums erwecken könnten, wie sie von PETRY (1961) bei der Allantois der Katze beschrieben wurden, konnten am vorliegenden Material nicht beobachtet werden. Das Plasma ausgebreiteter Fibrozyten zeigt zum Teil zahlreiche,

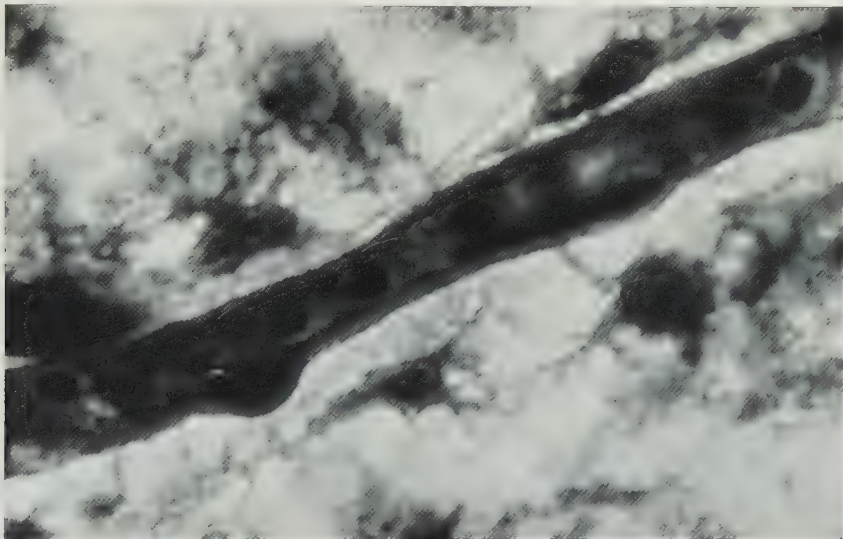


Abb. 12. Fibrozyten mit dendritenartigen Fortsätzen in der Umgebung eines Gefäßes. Totalpräparat Allantois, 12. Tag. Eisenhämatoxylin, Phasenkontrast, 1700fach

unmittelbar dem Kern angelagerte Vakuolen, die häufig auch in den Fortsätzen angetroffen werden. Andere Fibrozyten wieder besitzen ein besonders in Kernnähe verdichtetes Zytoplasma.

Auffallend sind die langen, manchmal über mehrere Gesichtsfelder ziehenden Fibrozytenketten (Abb. 13). Innerhalb dieser Ketten kommt es zur Verdoppelung der Fibrozyten und endlich entstehen doppelte Fibrozytenreihen. Gleiche Befunde haben BAUTZMANN u. SCHRÖDER (1953) beim frühembryonalen menschlichen Amnion und PETRY (1959) beim Schwein und Schaf erhoben und gezeigt, daß Gefäßsprossen durch solche Fibrozytenketten präformiert werden können. Bei der Allantois des Hühnchens konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen einer Gefäßneubildung und diesen Fibrozytenketten festgestellt werden.

Die Abb. 12 zeigt einem größeren Gefäß anliegende, „astrozytenähnliche“ Fibrozyten. Ihre Fortsätze verbinden sich untereinander und treten häufig mit dem Gefäß in enge Beziehung.

Die Histozyten sind in ihrer Form sehr verschieden. PETRY (1961) konnte bei der Allantois der Katze eine Formenreihe solcher Zellen zusammenstellen. Auffallend sind kleine, meistens in Gruppen liegende, lymphozytenähnliche Zellen



(Abb. 13). Im Häutchenpräparat erscheinen sie intensiver gefärbt als die Fibrozyten. Die größeren Zellen treten uns in unregelmäßig geformten, abgeflachten Zellen in wechselnder Menge entgegen. Ihre Kerne sind kleiner und dichter strukturiert als diejenigen der Fibrozyten, ihr Zytoplasma zeichnet sich durch eine schaumige Struktur aus. Die Plasmateile stellen sich bei allen Färbungen auffallend hell dar. Die Zellform selbst ist sehr variabel. Die Zelle kann nach allen Seiten Fortsätze entwickeln oder sie strecken sich von vornherein in die Länge. Solche Formen ähneln dann sehr den Fibrozyten, sind aber durch das helle Plasma stets von ihnen zu unterscheiden.

In der Nähe von Blutgefäßen treten oft granuliert Zellen auf, die mit den Ehrlichschen Mastzellen verglichen werden können. Die Gestalt dieser Zellen,

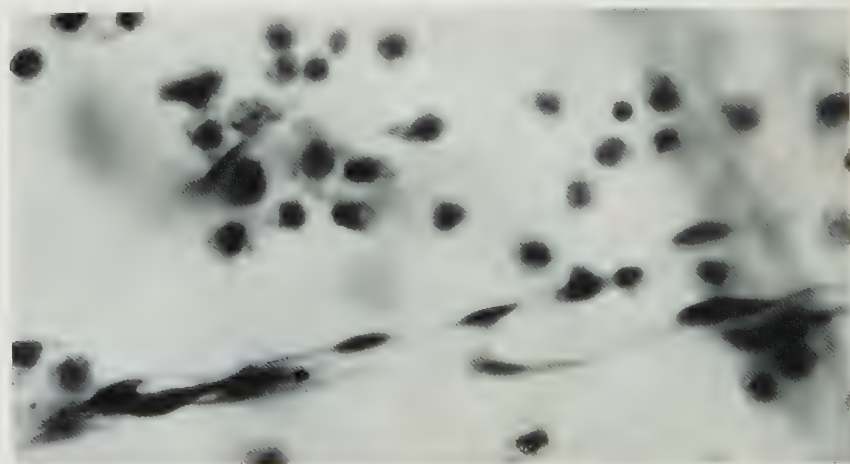


Abb. 13. Fibrozytenkette und Histiocyten im Allantois-44n-Logewebe. Totalpräparat Allantois, 12. Bebrütungstag, Eisenhämatocoxylin, 220fach

die einen kleinen, meist rundlichen Kern enthalten, ist sehr verschieden. Meistens sind sie kugelig, andere dagegen ausgebreitet wie Histiocyten. Einige Zellen sind mit kleinsten Granula so dicht besetzt, daß ihr Kern nicht mehr wahrgenommen werden kann. Über die Funktion dieser Zellen kann noch nichts ausgesagt werden.

### *III. Operative Eingriffe an der Allantois*

Im Rahmen der von der Allantois zu erfüllenden Stoffwechselfunktionen interessierte, in welchem Ausmaße sich Stoffwechselvorgänge ändern, wenn die normalen Verhältnisse in der Allantois gestört werden, oder wenn diese überhaupt fehlt. Alle im folgenden beschriebenen Eingriffe wurden bei einer Bebrütungszeit von 96—120 Std vorgenommen.

Durchtrennt man den Allantoisstiel mit den Blutgefäßen scharf ohne Unterbindung, dann sterben die Embryonen innerhalb 12—14 Std ab. Eine Blutstillung durch Kontraktion der Blutgefäße findet nicht statt. Auffallend war stets die rotbraune Verfärbung der Kutis der abgestorbenen Embryonen in allen Fällen, in denen die Allantois entfernt oder funktionsuntüchtig gemacht wurde.

Die Amnionblase dagegen war dabei immer unverletzt geblieben. Demgegenüber sind Embryonen, die aus anderer Ursache absterben, immer blaß. Diese merkwürdige Verfärbung könnte auf eine Veränderung des Blutes und auf eine Anhäufung der nicht mehr über die Allantois ausgeschiedenen Stoffe zurückgeführt werden.

Bei 15 Hühnchen wurde die Allantois am Stiel mit feinster Seide abgebunden und dann wie üblich weiter bebrütet. Bei 14 Hühnchen vergrößerte sich die Allantois nicht mehr. Eine Reihe von Embryonen entwickelten sich trotzdem noch 6 Tage weiter, wobei immer eine auffallend starke Volumenzunahme des

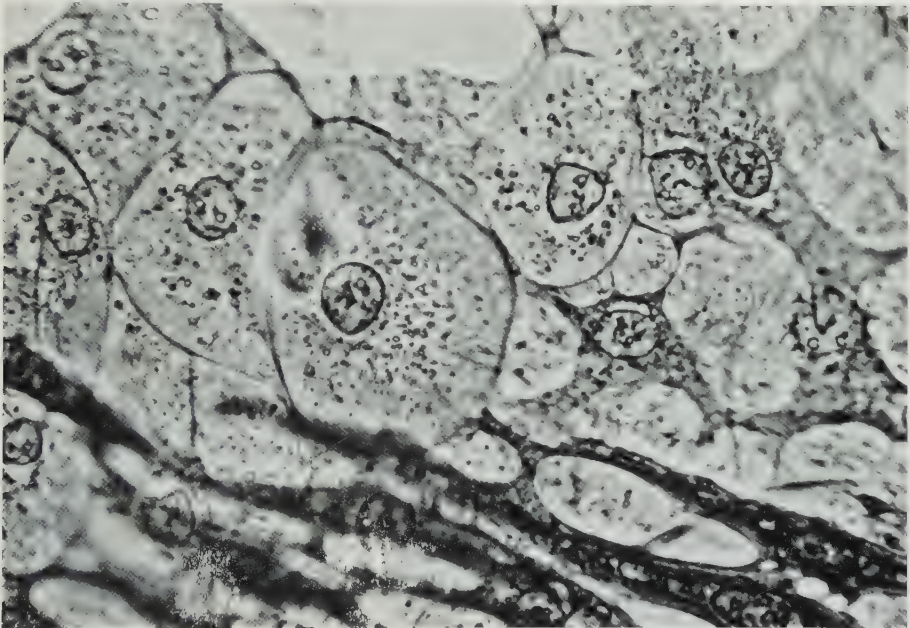


Abb. 14. Amnionepithel (oben) und Muskulatur (unten). Aus einem vergrößerten Amnion nach operativen Eingriff an der Allantois am 4. Tag (s. Text). Totalpräparat am 10. Bebrütungstag, Methylenblau, Phasenkontrast, 720fach

Amnions beobachtet werden konnte. Das Amnion war mit der Area vasculosa des Dottersackes und zum Teil auch mit dem immer regenerierten Chorion verwachsen.

In einem Falle entwickelte sich trotz der Unterbindung eine normal große Allantoisblase. Bei der Präparation am 12. Tage, also 8 Tage nach dem Eingriff, konnte hierbei festgestellt werden, daß nicht der gesamte Allantoisstiel abgebunden war, sondern lediglich ein großes Gefäß. Alle Hühnchen dieser Serie, die schon 24—48 Std nach dem Eingriff ad exitum kamen, zeigten Verletzungen im Bereiche der Area vasculosa und des Amnions.

Bei 75 Hühnchen wurde die Allantoisblase mit dem Thermokauter entweder völlig abgetragen und der Stiel verschorpt, oder die Allantoisblase nur durch Perforation mit dem Thermokauter an mehreren Stellen zum Zusammenfallen gebracht. Der Inhalt entleerte sich dabei in die Umgebung. Auch bei diesen Versuchen zeigte es sich, daß sich einige Embryonen ohne Allantois 6—7 Tage weiterentwickelten. Wie bei den Unterbindungen war auch hier eine auffallende Zunahme des Amnionvolumens festzustellen.

Von einem Hühnchen dieser Serie, das sich nach dem Eingriff 6 Tage weiterentwickelte, sollen an Hand einiger Abbildungen typische Veränderungen gezeigt werden. Die Häutchen wurden mit Methylenblau supravital gefärbt. Die Abb. 14 zeigt Amnionepithel und im unteren Bilddrittel Amnionmuskulatur. Das Amnionepithel stellt sich in Form unregelmäßig großer, abgerundeter Zellen dar, die zum Teil aufgeblasen erscheinen. Die Zellgrenzen sind deutlich, die Kerne meist kreisrund. Sie enthalten zwei bis drei Nukleoli. In Kernnähe treten zahlreiche Granula auf. Im Gegensatz zu den Befunden BAUTZMANNs (1953, Abb. 1) am normalen Amnion, ist jetzt das Plasma viel weniger vakuolisiert, vor allem

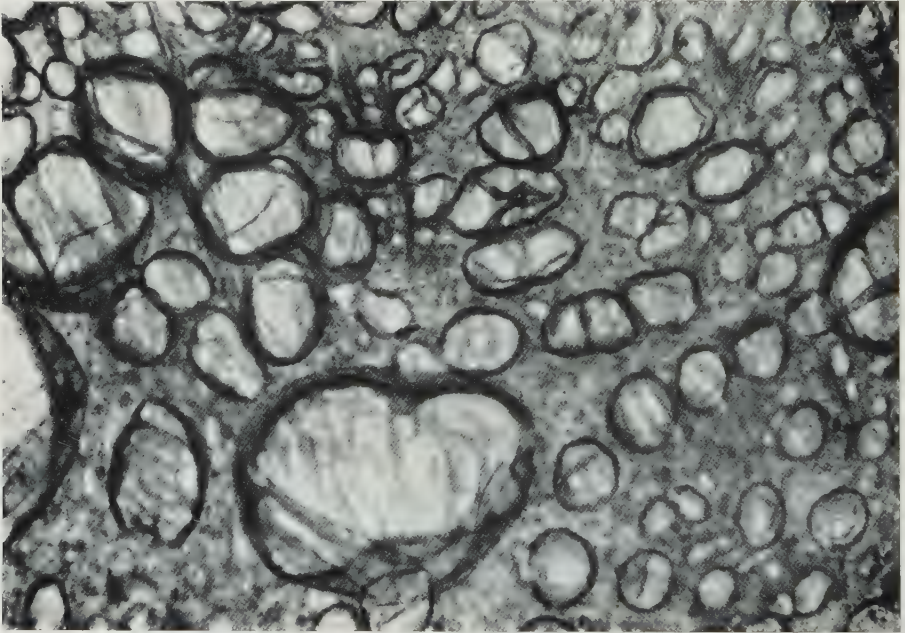


Abb. 15. Zysten im Amnion nach operativem Eingriff an der Allantois; gleiches Objekt wie Abb. 14. Total-Präparat; Methylenblau, 45fach

vermißt man die kernnahen Vakuolen, die zu diesem Zeitpunkt der Bebrütung bei normalen Amnien bereits große Ausmaße erreichen. Auch die Zellgrenzen verlaufen nicht mehr in gewellten Linien, wie das von BAUTZMANN u. SCHRÖDER (1953) beschrieben wurde. Dagegen treten jedoch verschieden große Zysten auf (Abb. 15), ähnlich wie es PETRY (1956) am Dottersack von *Chalcides* gezeigt hat. Durch die sehr dünn gespannten Zystenwände hindurch sieht man die Muskulatur des Amnions als streifige Schatten im Untergrund des Bildes. Die Abb. 16 zeigt die Amnionmuskulatur aus dem gleichen Präparat wie Abb. 14. Die Muskelzellen sind dunkler gefärbt, die Kerne oval und enthalten meistens zwei deutliche Nukleoli. Es hat den Anschein, als ob die Muskulatur infolge der Volumenzunahme des Amnions etwas hypertrophiere. Vergleiche mit den Abbildungen über die Amnionmuskulatur von BAUTZMANN u. SCHRÖDER (1953) zeigen, daß bei annähernd gleicher Vergrößerung die Querschnitte der einzelnen Muskeln dicker sind. Diese Frage soll an weiteren Versuchen verfolgt werden.



Im gleichen Präparat finden sich die von BAUTZMANN u. SCHRÖDER beschriebenen Muskelsterne in typischer Form.

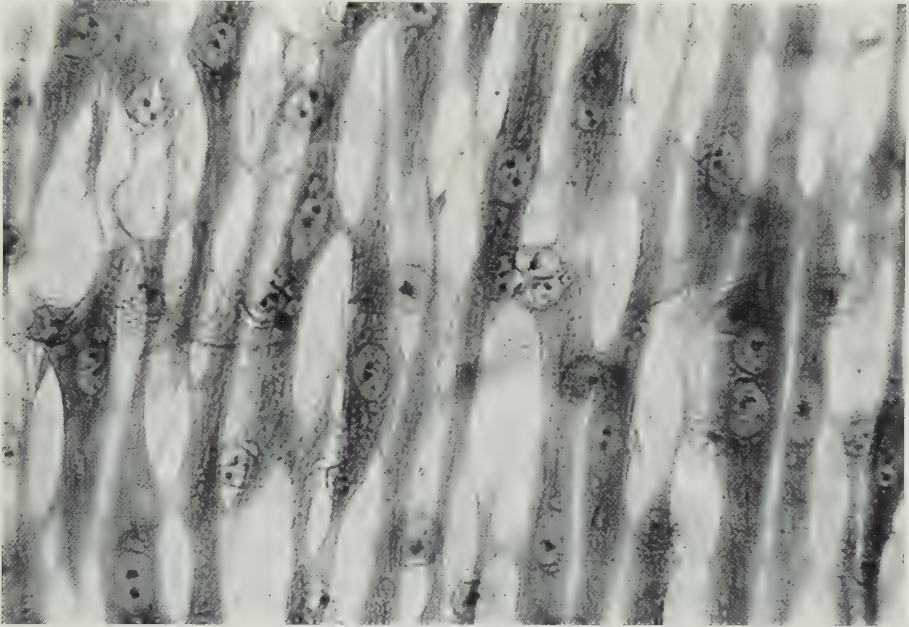


Abb. 16. Muskulatur des Amnion, im Untergrund Amnionepithel. Gleiches Präparat wie Abb. 14 und 15 (s. Text). Totalpräparat, Methylenblau, 560fach

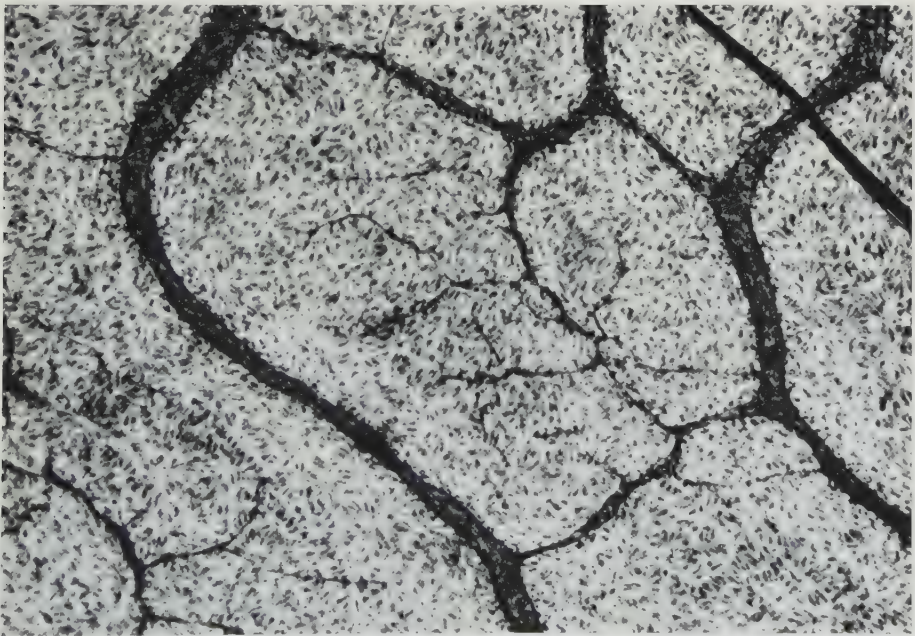


Abb. 17. Neugebildete Allantoisblase 5 Tage nach totaler Abtragung der Allantois am 4. Bebrütungstag (s. Text). Totalpräparat Allantois. Methylenblau, 45fach

In diesem Zusammenhange soll noch ein auffallendes unterschiedliches Verhalten verschiedener Embryonalhüllen des Hühnchens hinsichtlich ihrer Färbbarkeit erwähnt werden. Alle von normal bebrüteten Hühnchen gewonnenen Häutchen zeigten bei Supravitalfärbungen mit Methylenblau ein verwaschenes und trübes Aussehen. Die einzelnen Strukturen waren verschwommen, Zellgrenzen konnten fast nie ausgemacht werden, einerlei, ob es sich dabei um Amnion, Allantois oder Chorion handelte. Erstaunlicherweise war dies bei den operierten Hühnchen nicht der Fall. Alle Häutchenpräparate ließen sich mit der gleichen Methylenblaulösung ungleich besser anfärben und ergaben dann ein außerordentlich deutliches und scharf gezeichnetes Bild, wie es aus den Abb. 14—17 zu ersehen ist.

Überraschend ist der Befund, daß die Allantois anscheinend sehr schnell wieder regenerieren kann. In den Fällen, in denen die Allantois durch Koagulation an mehreren Stellen nur schlitzförmig eröffnet und zum Zusammenfallen gebracht wurde, entwickelte sich innerhalb weniger Tage eine neue Allantoisblase (Abb. 17). Wird die Allantois nur durch Stichelung verletzt, dann wird nach Schließung des Epitheldefektes die Blase rasch neu gefüllt, so daß nach wenigen Tagen die regenerierte Allantois an Größe und Struktur kaum von einer normal entwickelten zu unterscheiden ist. Selbst nach totaler Abtragung der Allantois mit dem Thermokauter kann sich aus dem Stiel eine neue Blase entwickeln, sofern hierbei kein zu starker Blutverlust auftrat. Auch hier verläuft die Regeneration verhältnismäßig rasch. Die so neugebildete Allantois unterscheidet sich jedoch von der normal entwickelten durch ein weniger ausgeprägtes Kapillarnetz (Abb. 17). Es ist jedoch noch zu prüfen, ob sich auch die dichte Kapillarisierung einstellt, wenn die neue Allantois sich mit dem Chorion verbindet. Das Epithel zeigt sich in der bereits beschriebenen Form. Auffallend war jedoch eine Ausrichtung der Fibrozyten (Abb. 17). Sie ordnen sich häufig radiär an und bilden fischschwarmähnliche Züge. Bei der Lupenvergrößerung gewinnt man gelegentlich Eindrücke von Muskelsternen. Aus welchem Grunde es zu einer solchen Ausrichtung kommt, kann nicht entschieden werden.

### E. Diskussion

Die Hinweise auf die Funktion der Allantois beim Hühnchen gaben Anlaß, die Morphologie dieser Hülle weiter zu klären und auf histologische Besonderheiten zu prüfen. Wie es PETRY (1953, 1954, 1957 und 1961) an den Embryonalhüllen verschiedener Spezies beschrieben hat, gibt es auch bei der Allantois des Hühnchens eine Anzahl von Einzelschichten mit charakteristischen Merkmalen. Sowohl die zellulären als auch die bindegewebigen Elemente verleihen den verschiedenen, im Häutchenpräparat oder Flachschnitt dargestellten Schichten ein besonderes Aussehen. Die Differenzierung dieser Elemente ist so ausgeprägt, daß man sie ohne weiteres auseinanderhalten kann. Dies scheint besonders im Hinblick auf weitere Untersuchungen, die sich mit dem Stofftransport befassen, wichtig. Die Erfassung der strukturellen Besonderheiten, die bisher nicht beobachtet wurden, war das Ziel der vorliegenden Untersuchung.

Es besteht offensichtlich eine Wechselbeziehung zwischen der Ausbildung der Allantois und der im Laufe der Entwicklung auftretenden Dotterreduzierung. Der Dottervorrat nimmt durch Verflüssigung und Verbrauch ab. Der ständig zunehmende Bedarf des Embryo an Eiweiß und Sauerstoff kann vom Dotter allein nicht gedeckt werden. Der Dottersack schrumpft und wird vor dem Schlüpfen des Hühnchens ganz in die Bauchhöhle zurückgenommen. Die Allantois



tois schließlich füllt das gesamte extraembryonale Cölom aus und gewinnt am spitzen Eipol enge Beziehungen zum Eiweiß als neuer Nahrungsquelle.

Das *Allantoisepithel* des Hühnchens unterscheidet sich in seiner äußeren Form von den bisher untersuchten Spezies (PETRY 1959; Schwein, Schaf, Kaninchen, Hund, Chalcides) nicht wesentlich. Eine Ausnahme findet sich nur bei der Katzenallantois, die zytologische Besonderheiten aufweist (PETRY 1961). Im Gegensatz hierzu macht das Allantoisepithel des Hühnchens im histologischen Bild den Eindruck einer weniger aktiven Zellschicht. Wohl werden Vakuolen angetroffen. Stärkere Vakuolisierungen jedoch wie beim menschlichen Amnion (PETRY u. DAMMINGER 1956) fehlen. Auch die im Amnion des Hühnchens von BAUTZMANN (1955) beschriebenen „Kolossalzellen“ konnten in der Allantois nicht nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der feinen Granula, die besonders in Kernnähe gehäuft auftreten, finden sich keine auffälligen zytologischen Besonderheiten. Die Allantoisepithelzellen zeigen an manchen Stellen eine unterschiedliche Anfärbbarkeit, ein Phänomen, das BAUTZMANN u. SCHRÖDER (1953) und PETRY (1956) am Amnion beschrieben haben. Die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Katzenallantois (PETRY 1961) ist auf den verschiedenen Glykogengehalt dieser Zellen zurückzuführen. Dort sind die Zellen voll mit Glykogen gepackt, so daß die ganze Zelloberfläche als eine homogene rote Masse erscheint. In der Allantois des Hühnchens jedoch ist Glykogen nicht nachweisbar.

TOMITA (1959) gibt an, daß er bei seinen Untersuchungen in der Allantoisflüssigkeit des Hühnchens niemals Zucker gefunden hat. Im Gegensatz dazu fanden GRÜBER und GRÜNBAUM (M. m. W. 1904) in der Allantoisflüssigkeit von Rind, Schwein und Ziege Fruktose. Im frischen sowie im bebrüteten Hühnerei findet man aber immer Glykogen (0,012—1,101 g als Glukose berechnet). TOMITA (1959) fand, daß die Kohlenhydrate des Hühnereies aus freien und gebundenen Zuckern sowie aus Glykogen bestehen. Der Gehalt an gesamten Kohlenhydraten soll an den einzelnen Bebrütungstagen schwanken. Das frische Ei enthält 350 mg Gesamtkohlenhydrate; bei der Bebrütung sinkt der Gehalt allmählich ab und erreicht am 15. Tage den niedrigsten Wert. Die Glykogenvorräte im Dotter und Eiweiß nehmen während der Bebrütung noch schneller ab und erreichen bereits am 10. Tage den niedrigsten Wert, nämlich weniger als 50 mg (nach TOMITA 1959).

Diese chemisch gesicherten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den oben erwähnten histochemischen Befunden. Es muß demnach angenommen werden, daß die im Dotter und Eiweiß in großer Menge vorkommenden Fermente die Kohlenhydrate vor der Resorption völlig aufspalten. Das gleiche gilt für Fette und Lipide. Dotter und Eiweiß sind reich an Lipase. Es ist wahrscheinlich, daß es ähnlich wie im Dünndarm vor der Resorption zu einer Spaltung der Fette in Glycerin und Fettsäuren kommt. Die Bemühungen, in der Allantois Fette und Lipide nachzuweisen, verliefen ergebnislos. TOMITA hat gefunden, daß 40% der durch Fettspaltung freiwerdenden Fettsäuren während der Bebrütung verbrannt werden. Das dabei gebildete Wasser soll der Erhaltung des Wassergleichgewichtes des Embryo dienen. Die Allantoisflüssigkeit, die sich fast quantitativ sammeln ließ, betrug im Mittel etwa 2 cm<sup>3</sup>. Bis zum zehnten Bebrütungstage war die Allantoisflüssigkeit dünnflüssig, klar und blaßgelb, mit weiterer Entwicklung wird sie viskös, weißlich getrübt. Nach den Untersuchungen von TERUMI (1927) betrug der Gesamt-N-Gehalt in der Allantoisflüssigkeit am 9. Tage 57,0 mg-%, am 17. Tage bereits 504,0 mg-%.

Das *Bindegewebsgerüst* der Allantois besteht aus argyrophilen und kollagenen Netzwerken. Diese sind in ihrer Textur mit den entsprechenden Schichten der



Embryonalhüllen anderer Spezies durchaus vergleichbar. Unterschiede treten nur insofern auf, als bei größerer Wandspannung die Fasern straff ausgerichtet, bei Allantoisblasen mit weniger großer Spannung mehr wellig verlaufende Fasern angetroffen werden. Das Fasergerüst des Allantoisbindegewebes zeigt große Ähnlichkeit mit dem des Dottersackes der Ratte. Wie dieses bildet es ebenfalls ein dichtes, dreidimensionales Maschenwerk, das zum Allantoisepithel hin immer zarter wird und schließlich eine aus feinsten, verdichteten Gitterfasern bestehende basale Schicht bildet. Bei allen bisher untersuchten Membranen beginnt das Bindegewebsgerüst mit einer solchen basalen Schicht. Das Fasernetz der Hühnchenallantois blieb in der zweiten Hälfte der Bebrütungszeit völlig gleich. Unterschiede fanden sich nur in der Dicke der einzelnen Fibrillen. Die Netze bestehen aus langen, bogenförmigen Fasern, die in geschlängelten und gewellten Linien durch das Blickfeld ziehen und verschieden große Maschen bilden. In dieses Netzwerk sind die Gefäße eingebaut, über denen die Faserkonstruktionen besonders engmaschig werden.

Das dem Amnion anliegende Allantoisgebiet zeigt in versilberten Häutchenpräparaten besonders deutlich und eindrucksvoll das Bild einer Membran, deren Bindegewebsgerüst Ähnlichkeit mit dem des menschlichen Amnions aufweist. Für die Festigkeit haben diese dichten Netze besonders bei den Entwicklungsstadien der Allantois eine Bedeutung, wenn sie als prall gefülltes rundliches Bläschen vorliegt. In dieser Entwicklungsphase steht die Allantoisblase unter einem zunehmenden Druck. Durch die intensive Verankerung der Gitterfasern an und um die feinsten Kapillarnetze wird die sonst in bindegewebigen Membranen zu beobachtende Verschieblichkeit und Dehnbarkeit (z. B. Amnion beim Menschen) anscheinend wesentlich herabgesetzt. Bei der Präparation älterer Embryonen fiel auf, daß das Allanto-Chorion viel leichter verletzlich ist als das freie Allantoisgebiet, obwohl das Gitterfasergerüst praktisch bei beiden gleich ausgebildet ist. Bevor das Chorion von der Allantois vaskularisiert wird, ist es bis zu einem gewissen Grade dehnbar und reißt nicht so leicht ein wie später, wenn das dichte Kapillarnetz ausgebildet ist. Das dem Amnion anliegende Allantoisgebiet dagegen führt nur einige große Gefäße und verwächst nicht mit dem Amnion. Glatte Muskulatur, wie sie im Amnion des Hühnchens (BAUTZMANN u. SCHRÖDER 1953) beschrieben wurde, kommt in der Allantois nicht vor. Die im Allanto-Amnionbindegewebe bei der Katze und besonders bei Schwein und Schaf gefundenen langen dünnen Fasern (PETRY 1959 und 1961), die sich in ungewohnter Weise aufzweigen und sich über mehrere Gesichtsfelder erstrecken können, wurden im Allantoisbindegewebe des Hühnchens nicht nachgewiesen.

Dagegen sind spätestens am 5. Entwicklungstage die typischen Faserstrukturen sichtbar, die in der gleichen Form noch bei späteren Stadien bis zum Schlüpftermin gefunden werden. Diese schon früh auftretenden Bindegewebsnetze sind nicht als starre endgültige Formationen aufzufassen. Da ihre Strukturen in den späteren Stadien gleich bleiben, sich andererseits aber die Allantoisblase um ein Vielfaches vergrößert, müssen sie während der Entwicklung laufend um- und neugebildet werden. Wenn man nur eine ausschließliche zelluläre Genese der Fasern annimmt, dann ist diese laufende Neuorganisation nicht ganz verständlich. Es müssen sich im interzellulären Raum auch hier fibrillogenetische Vorgänge nach Art einer „Kristallisation“ abspielen, wie sie von PETRY

(1954) bei der Bildung feinsten Gitterfaserstrukturen in der Zwischenschicht der menschlichen Eihäute beschrieben wurde (vgl. Abb. 7 mit der Abb. 9 von PETRY 1954, S. 662).

Eine bisher noch nicht geklärte Frage sind die Bedingungen, die für die Ausbildung des außerordentlich dichten Kapillarnetzes des Allanto-Chorion verantwortlich zu machen sind. Der auffallende Unterschied der Gefäßdichte zwischen freier Allantois und dem Allanto-Chorion läßt eine induzierende Wirkung des Chorions bei der Bildung der beschriebenen sinusoiden, dem Allantoisystem entstammenden Kapillarnetze vermuten, die erst dann auftreten, wenn die Allantois mit dem Chorion in Verbindung tritt. Die Gefäße des dem Amnion zugekehrten Allantoisgebietes entwickeln kein Kapillarnetz. Ob ihnen dort, wo sich die Allantois in späteren Entwicklungsstadien dem Eiweiß nähert, resorptive Funktionen zukommen, kann noch nicht beantwortet werden. Es wäre in weiteren Untersuchungen zu prüfen, inwieweit auch die Chorio-Allantois außer zur „Atmungsfunktion“ zu einer resorptiven Leistung fähig ist.

Totale Präparate von Membranen eignen sich als ideale Objekte zum Studium der Bindegewebszellen, vor allem auch hinsichtlich der Verhältnisse an der Epithel-Bindegewebsgrenze. Während an den bisher untersuchten Spezies (z. B. Schwein, Schaf, Katze, Chalcides, Kaninchen; PETRY 1959 und 1961) das zelluläre Bild des subepithelialen Bindegewebes sich als sehr vielfältig erwies, ist in den entsprechenden Membranen des Hühnchens dieses Bild verhältnismäßig eintönig. Die am Bindegewebe der Allantois erhobenen Befunde gleichen im wesentlichen denen von BAUTZMANN u. SCHRÖDER (1953) am Amnionbindegewebe.

Im Vergleich zu den Säugern sind die Bindegewebszellen der Sauropsiden auffallend weniger differenziert. Als Ursache hierfür kann der Unterschied in der funktionellen Beanspruchung des Bindegewebes diskutiert werden. Dort wo feto-materne Grenzflächen mit einem entsprechenden Stoffaustausch vorliegen, wird die Notwendigkeit einer Reaktion des Bindegewebes sowohl auf der mütterlichen als auch auf der fetalen Seite ohne weiteres verständlich. Die embryonalen Hüllen des Vogelkeimes dagegen unterliegen praktisch keiner durch den Stoffwechsel bedingten Beeinflussung seitens des extraembryonalen Milieus.

Die ersten operativen Eingriffe an 100 Hühnchen zeigten, daß das Allantoisgewebe über eine erstaunliche Regenerationsfähigkeit verfügt. Die hierbei erhobenen histologischen Befunde sollen nicht weiter diskutiert werden. Jedoch könnten durch solche Versuche über die Richtung und die Art des Flüssigkeitsumlaufes innerhalb der verschiedenen Flüssigkeitsdepots Einblicke gewonnen werden. Nach BAUTZMANN, SCHMIDT und LEMBERG (1960) besteht ein Zirkulationsweg des Liquor amnii über den Embryonalkörper. In die Amnionhöhle applizierte Stoffe werden vom Embryo aufgenommen. Außer diesem Zirkulationsweg müssen noch weitere Wege möglich sein; denn einmal enthält das Eiweiß bis zu 86% Wasser, andererseits entsteht auch bei der Verbrennung im embryonalen Körper Wasser und schließlich existiert die mit Flüssigkeit gefüllte Allantoisblase. Der Inhalt letzterer beträgt nach TOMITA (1959) vom 7. Tage an bis zum 19. Tag im Mittel  $2\text{ cm}^3$ . Dies steht allerdings im Widerspruch zu den angeblichen praktischen Erfahrungen der Serologen bei der Gewinnung von Allantoisflüssigkeit an virusbeimpften Hühnereiern, bei denen etwa zwischen dem 13. und 17. Bebrütungstage bis zu  $10\text{ cm}^3$  Flüssigkeit gewonnen werden

soll. Der Rest-N erhöht sich in der gleichen Zeit jedoch von 57,0 mg-% auf 504,0 (!) mg-%. Hieraus kann gefolgert werden, daß die Allantois zunehmend Wasser wieder rückresorbieren muß. Erwähnenwert erscheinen in diesem Zusammenhang die Befunde, daß nach operativen Eingriffen, bei denen die Allantois durch Eröffnung zum Zusammenfallen gebracht wurde, innerhalb relativ kurzer Zeit die Blase wieder regeneriert und sich auf die ursprüngliche Flüssigkeitsmenge wieder auffüllt. Wird andererseits die Allantois so weit zerstört, daß keine Regenerationsmöglichkeit besteht, dann reagiert das Amnion mit einer auffallenden Vergrößerung nach Art eines „Hydramnions“. Es besteht daher die Möglichkeit einer Wechselbeziehung zwischen der Funktion des Amnions und der Allantois. Dieser Frage wird zur Zeit durch weitere Versuche nachgegangen.

### Zusammenfassung

Im Rahmen der vergleichenden Untersuchungen über den Bau und die Funktion der Embryonalhüllen wird in der vorliegenden Arbeit über die Allantois des Hühnchens berichtet. Die Untersuchungen gaben Anlaß zu prüfen, inwieweit sich Stoffwechselvorgänge ändern, wenn die normalen Beziehungen von Allantois zu Chorion und Amnion gestört werden. Die Befunde wurden an totalen Häutchenpräparaten sowie an Flach- und Querschnitten erhoben. Sie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Das Allantoisepithel besteht aus großen, flach-kubischen und geradlinig begrenzten Zellen, die eine unterschiedliche Anfärbbarkeit aufweisen. Die Vermehrung erfolgt mitotisch. Kerngrößen und Kernformen variieren geringgradig. Vakuolenbildungen werden mit der resorptiven Funktion der Allantois in Zusammenhang gebracht. Glykogen und Lipide können im Epithel nicht nachgewiesen werden.

2. Das subepitheliale Bindegewebe beginnt mit einer aus feinsten Gitterfasern bestehenden basalen Schicht, die in ein grobmaschiges Netzwerk übergeht, in dem die Allantoisgefäße verankert und eingebaut sind. Die Unterschiede in der Architektur der Gitterfasersysteme in Allanto-Chorion und freier Allantois werden herausgestellt.

3. Das Blutgefäßsystem wird in zwei unterschiedliche Gebiete aufgeteilt. Das Allanto-Chorion ist durch das sich hier ausbreitende sinusoide, dem Chorion zugeordnete dichte Kapillarnetz charakterisiert. Die freie Allantois entwickelt kein ausgesprochenes Kapillarnetz. Das morphologische Bild des Allanto-Chorion entspricht dem einer besonders stoffwechselaktiven Membran.

4. Die Bindegewebszellen zeigen im Vergleich zu den entsprechenden Hüllen bei Säugern ein viel einfacheres Bild. Die Fibrozyten und Histiozyten sind zum größten Teil an das Begleitbindegewebe der Blutgefäße gebunden. Die feinsten Fortsätze mehrerer Fibrozyten hängen untereinander zusammen. Neben Fibrozyten und Histiozyten kommen kleine lymphozytenähnliche Zellen vor, deren Beziehungen zu Histiozyten durch experimentelle Untersuchungen noch weiter verfolgt werden sollen. Die relative Zellarmut des Allantoisbindegewebes wird diskutiert.

5. An 100 Hühnchen zwischen dem 4. und 6. Bebrütungstag wurde die Allantois entweder nach Abbinden am Stiel ganz entfernt oder durch Stichelungen zum Zusammenfallen gebracht.



6. Die Embryonen können diesen Eingriff bis zum 12. Tag überstehen. Nach totaler Entfernung der Allantois und nach Abbinden des Allantoisstieles vergrößert sich das Amnion. Hierbei wurde eine Hypertrophie der Amnionmuskulatur, eine Vergrößerung der Amnionepithelzellen sowie das Auftreten multipler Epithelzysten beobachtet.

7. Die Allantois kann sich aus Stielresten sowie nach Stichelung vollkommen regenerieren, wobei nach kurzer Zeit die dem Entwicklungsstand entsprechende Größe wieder erreicht wird.

8. Findet die sich wieder regenerierende Allantois keinen Anschluß an das Chorion, dann bleibt die typische Kapillarbildung aus und das Gefäßnetz entspricht dem der freien Allantois.

9. Die Ergebnisse der operativen Eingriffe veranlassen zu der Annahme, daß nicht nur der von BAUTZMANN beschriebene Flüssigkeitsaustausch zwischen Amnionwasser und Embryo von Bedeutung ist, sondern daß noch andere Zirkulationswege möglich sind. Die Flüssigkeitsmenge in der Allantois bleibt während der gesamten Bebrütungszeit nahezu gleich, während sich die Menge der ausgeschiedenen Stoffe verzehnfacht. Die Allantois scheint demnach Wasser rückresorbieren zu können. Andererseits muß die Chorioallantois bei der Resorption des Eiweißes das darin enthaltene Wasser (86%) notwendigerweise mit resorbieren. Nach Entfernung der Allantois nimmt das Amnionvolumen zu. Daraus läßt sich folgern, daß ein Zusammenhang in der Funktion des Amnions und der Allantois bestehen muß.

### Literatur

- BAUTZMANN, H.: Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Das Amnion der Reptilien am Beispiel der Kreuzotter. *Z. Zellforsch.* **42**, 344—364 (1955).
- Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Neue Befunde am menschlichen Amnion mit Einschluß seiner freien Bindegewebs- und sogenannten Hofbauer-Zellen. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **119**, 7—22 (1955a).
- Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Das Amnion der Säuger am Beispiel des Schafes. *Z. Zellforsch.* **43**, 48—63 (1955c).
- Fruchthüllenmotorik und Embryokinese, ihre Natur und ihre Bedeutung für eine physiologische Embryonalentwicklung bei Tier und Mensch. *Arch. Gynäk.* **187**, 519—545 (1956).
- , u. CH. HERTENSTEIN: Zur Histogenese und Histologie des menschlichen fetalen und Neugeborenen-Amnion. *Z. Zellforsch.* **45**, 589—611 (1957).
- , u. W. SCHMIDT: Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen am Amnion von Sauropsiden und Mammaliern (Huhn, Katze, Mensch). *Z. Zellforsch.* **51**, 571—588 (1960).
- and P. LEMBERG: Experimental electron- and light-microscopical studies on the function of the amnionapparatus of the chick, the cat and man. *Anat. Anz.* **108**, H. 18/24 (1960).
- , u. R. SCHRÖDER: Studien zur funktionellen Histologie und Histogenese des Amnions beim Hühnchen und beim Menschen. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **117**, 166—214 (1953).
- — Über Vorkommen und Bedeutung von „Hofbauer-Zellen“ im Myometrium und Decidua der graviden weißen Ratte. *Z. Zellforsch.* **47**, 1—6 (1957).
- GOERTTLER, K.: Entwicklungsgeschichte des Menschen. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950.
- GROSSER, O.: Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta. Wien u. Leipzig: Wilhelm Braumöller 1909.
- HERTWIG, O.: Entwicklungsgeschichte des Menschen und der Wirbeltiere. Jena: Verlag Gustav Fischer 1886.
- KAMAI, T.: Untersuchungen über die physikalischen Eigenschaften und die chemische Zusammensetzung der Amnion- und Allantoisflüssigkeit des Hühnerembryos. *Hoppe-Seylers-Z. physiol. Chem.* **171**, H. 1/3, 101—113 (1927).

- PETRY, G.: Untersuchungen über den Bau der menschlichen Eihüllen. Verh. Anat. Ges., 51. Verslg Mainz 1953, S. 140—144.
- Studien über die morphologischen Grundlagen des Blasensprunges. Zbl. Gynäk. **76**, 655—675 (1954).
- Über die Struktur der menschlichen Eihäute. Cong. Internat. de Gynècol. et d'Obstetricque Genève, 1954.
- Vergleichende Studien am Dottersack. Verh. Anat. Ges., 53. Verslg Stockholm 1956, S. 305—315.
- Vergleichende morphologische Untersuchungen an der Allantois. Verh. Anat. Ges., 56. Verslg Zürich 1959.
- Über eine besondere Funktionsform des Epithels. Naturwissenschaften **47** (1960).
- Histotopographische und cytologische Studien an den Embryonalhüllen der Katze. Z. Zellforsch. **53**, 339—393 (1961).
- , u. K. DAMMINGER: Untersuchungen über den Bau des menschlichen Amnions. Z. Zellforsch. **44**, 225—262 (1955/56).
- , u. S. ZULEGER: Vergleichende Studie über den Bau der Eihüllen der Ratte. Z. Zellforsch. **47**, 683—712 (1958).
- TOMITA, M.: Das Ei. Lehr- und Handbuch für Ärzte, Biologen und Chemiker. Der Stoffwechsel, Teil 2, Bandteil c. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- WITT, G., u. D. SCHYMA: K, Na und Ca in der Amnion- und Allantoisflüssigkeit des bebrüteten Hühnereies. Naturwissenschaften **47**, 16 (1960).

Dr. W. KÜHNEL, Anatomisches Institut der Universität,  
Marburg a. d. Lahn, Robert-Koch-Strasse 6

## Autorenverzeichnis des 54. Bandes

- ALBERTI, P. s. CAUNA, N. S. 158
- BARGMANN, W., und A. KNOOP, Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Reptilien- und Vogellunge. S. 541
- BROWN, S. s. SCHARRE, E. S. 530
- BUCHER, O., und E. REALE, Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung der juxtaglomerulären Spezialeinrichtungen der Niere. I. Mitteilung. Problemstellung und erste Beobachtungen. S. 167
- CAESAR, R., Elektronenmikroskopischer Nachweis von Fettpartikeln im Dissechen Raum. S. 793
- CARSTEN, P.-M., Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Sinuswand menschlicher fetaler Lebern. S. 252
- CAUNA, N., and P. ALBERTI, Nerve supply and distribution of cholinesterase activity in the external nose of the mole. S. 158
- COTTE, G., et N. COTTE, Etude ultrastructurale d'images de fonte holocrine dans la cortico-surrénale. S. 182
- COTTE, N. s. COTTE, G. S. 182
- ENGEL, H.-J., und E. ZERST, Über die Degeneration der Leukozyten in vitro. (Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop.) S. 511
- FÄHRMANN, W., Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Nervensystems von *Unio tumidus* (PHILIPSON) unter besonderer Berücksichtigung der Neurosekretion. S. 689
- FERNER, H., und I. MÜLLER, Die Bildung der Kopfkappe (Akrosom) bei der Spermientwicklung des Mauswiesels (*Mustela nivalis* L.). S. 105
- FJERDINGSTAD, E. J., Ultrastructure of the collar of the choanoflagellate *Codonosiga botrytis* (EHRENB.). S. 499
- FUJITA, H., and J. F. HARTMANN, Electron microscopy of neurohypophysis in normal adrenaline-treated and pilocarpine-treated rabbits. S. 734
- HARTMANN, J. F. s. FUJITA, H. S. 734
- HARTMANN, J. FRANCIS s. HUDSON, G. S. 147
- HOFFMEISTER, H., Morphologische Beobachtungen an erschöpften indirekten Flugmuskeln der Wespe. S. 402
- HORSTMANN, E., Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Spermiohistogenese beim Menschen. S. 68
- HUDSON, G., and J. FRANCIS HARTMANN, The relationship between dense bodies and mitochondria in motor neurones. S. 147
- KITZING, W., und H. H. SCHUMACHER, Ontogenese und topographische Histochemie der Bernsteinsäuredehydrogenase in der Leber einiger Nager. Untersuchungen zur funktionellen Gliederung des Leberparenchyms. S. 443
- KNESE, K.-H., und A.-M. KNOOP, Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Zellen in der Eröffnungszone des Epiphysenknorpels. S. 1
- KNOCHE, H., Morphologisch-experimenteller Beitrag zum lichtmikroskopischen Bau des vegetativen Nervensystems. I. Mitteilung. Die Endigungsweise der präganglionären Nervenfasern. S. 207
- KNOOP, A. s. BARGMANN, W. S. 541
- KNOOP, A.-M. s. KNESE, K.-H. S. 1
- KÜHNEL, W., Morphologische und experimentelle Untersuchungen an der Allantois des Hühnchens. S. 807
- LAWES, D. F., Hypothalamic neurosecretion in the refractory and post-refractory periods and its relationship to the rate of photoperiodically induced testicular growth in *Zonotrichia leucophrys gambelii*. S. 275
- LIERSE, W., Die Kapillarabstände in verschiedenen Hirnregionen der Katze. S. 199
- MASSIMELLO, G. s. PEYROT, A. S. 764
- MERKER, H.-J., Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Bildung der *Zona pellucida* in den Follikeln des Kaninchenovars. S. 677
- MEYER, G. F., Interzelluläre Brücken (Fusome) im Hoden und im Ei-Nährzellverband von *Drosophila melanogaster*. S. 238
- MÜLLER, I. s. FERNER, H. S. 105
- MÜLLER-MOHNSEN, H., Strukturveränderungen des Ranvierschen Schnürrings während des Elektrotonus und während der funktionellen Zerstörung. S. 468



- NAKAJIMA, Y., Electron microscope observations on the nerve fibers of *Cristaria plicata*. S. 262
- NISHITSUTSUJI-UWO, J., Electron microscopic studies on the neurosecretory system in lepidoptera. S. 613
- OHMI, S., Electron microscopic study on Wallerian degeneration of the peripheral nerve. S. 39
- OKSCHE, A., Der histochemisch nachweisbare Glykogenaufbau und -abbau in den Astrocyten und Ependymzellen als Beispiel einer funktionsabhängigen Stoffwechselaktivität der Neuroglia. S. 307
- Vergleichende Untersuchungen über die sekretorische Aktivität des Subkommissuralorgans und den Gliacharakter seiner Zellen. S. 549
- OLSSON, R., The skin of amphioxus. S. 90
- OTREMBIA, P., Beobachtungen an neurosekretorischen Zellen des Regenwurmes (*Lumbricus spec.*). S. 421
- OVERBECK, L. s. PETRY, G., und W. VOGELL. S. 382
- PETRY, G., L. OVERBECK und W. VOGELL, Vergleichende elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen am Vaginalepithel in der Schwangerschaft. S. 382
- PEYROT, A., et G. MASSIMELLO, Le rein du triton crêté (*Triturus cristatus carnifex*. LAUR.) Étude morphologique, cytologique et cytochimique. S. 764
- PRABHU, V. K. K., The structure of the cerebral glands and connective bodies of *Jonespeltis splendidus* VERHOEFF (Myriapoda: Diplopoda). S. 717
- REALE, E. s. BUCHER, O. S. 167
- RÖHLICH, P., und L. J. TÖRÖK, Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Auges von Planarien. S. 362
- SCHARRER, E., and S. BROWN, Neurosecretion. XII. The formation of neurosecretory granules in the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. S. 530
- SCHMIDT, W., Elektronenmikroskopische Untersuchung des intrazellulären Stofftransportes in der Dünndarmepithelzelle nach Markierung mit Myofer. S. 803
- s. WARTENBERG, H. S. 118
- SCHUMACHER, H. H. s. KITZING, W. S. 443
- TÖRÖK, L. J. s. RÖHLICH, P. S. 362
- TRUJILLO-CENÓZ, O., Electron microscope observations on chemo- and mechanoreceptor cells of fishes. S. 654
- VOGELL, W. s. PETRY, G., und L. OVERBECK. S. 382
- WARTENBERG, H., und W. SCHMIDT, Elektronenmikroskopische Untersuchungen der strukturellen Veränderungen im Rindenbereich des Amphibieneies im Ovar und nach der Befruchtung. S. 118
- WITTEKIND, D., Über das Verhalten von lebenden Blut- und Exsudatzellen in hochprozentigen, isotonischen Eiweißlösungen. S. 631
- ZERBST, E. s. ENGEL, H.-J. S. 511
- ZWILLENBERG, L. O., Histochemische Beobachtungen am *Saccus vasculosus* der Forelle. S. 437



# Aufnahmebedingungen

## I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

## II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierter Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargestellt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.
3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel *nur ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.
6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung und Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonebildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonezeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.
- Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweis Pfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.
7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.
8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.
10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.





# **Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste**

Von Dr. med. GÜNTER KERSTING,  
Privatdozent für experimentelle Neurologie und Neuropathologie  
an der Universität Bonn

(Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie.  
Herausgegeben von M. MÜLLER, Bern · H. SPATZ, Gießen · P. VOGEL, Heidelberg. Heft 90)

Mit 108 Abbildungen. VI, 117 Seiten Gr.-8°, 1961. DM 56,—

## **INHALTSÜBERSICHT**

Einleitung: Die Ordnung der Hirngeschwülste und die Bedeutung der Gewebszüchtung für die experimentelle Geschwulstforschung · Eigene Untersuchungen: Material und Methoden. Die Explantation der Gewebe, Ergebnisse · Die einzelnen Geschwulstarten: Medulloblastome. Spongioblastome. Oligodendrogliome. Astrozytome. Glioblastome. Die Paragliome (Ependymome und Plexuspapillome). Neurinome. Meningeome. Hämangioblastome (LINDAU). Die Geschwülste der Hypophysengegend. Metastatische Hirngeschwülste. Die Melanoblastome. Die Gewebszüchtung normalen Hirngewebes · Zusammenfassende Beurteilung: Die Proliferationsgeschwindigkeit der Hirngeschwülste in vitro. Die Erhaltung geschwulstcharakteristischer Strukturen in vitro. Cytologische Homogenität und Heterogenität der Hirngeschwulstkultur. Die morphologischen Beziehungen zwischen den Geschwulstzellen und den Zellelementen normalen reifen oder unreifen Hirngewebes in vitro · Schlußbetrachtung · Literatur · Sachverzeichnis.

**SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**